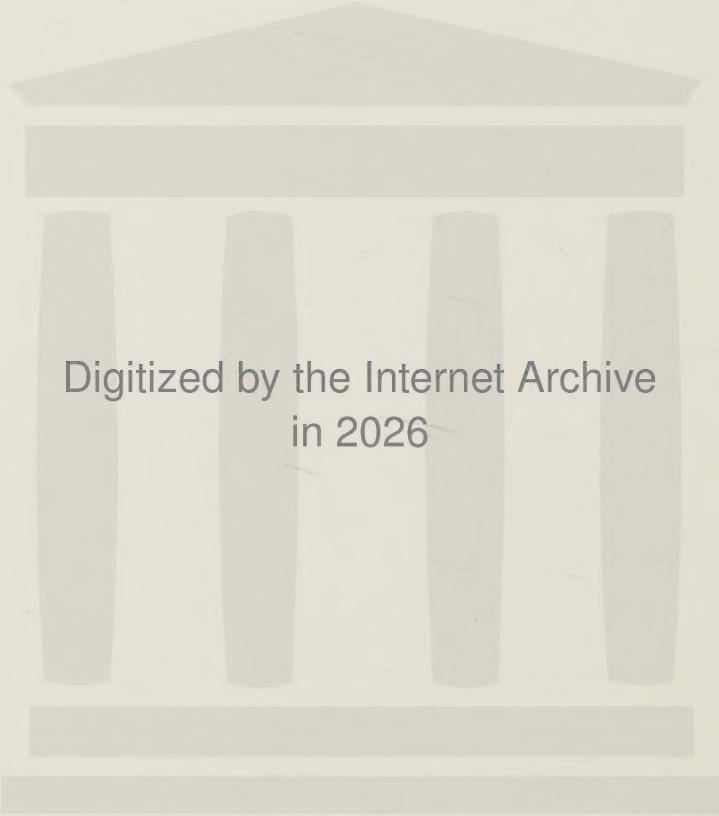


Wachstum und
Strahlenreaktion eines spontanen,
transplantablen Nierenkarzinoms
der NMRI-Maus

Gerd Merinsky

Diss München
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548306_0052

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. G. Riethmüller

Wachstum und Strahlenreaktion
eines spontanen,transplantablen
Nierenkarzinoms der NMRI-Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Gerd Merinsky
aus
Schwäbisch Gmünd

1984

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K.-R. Trott
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Riethmüller
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	27.3.1984

Für die Überlassung des Themas und die aktive Förderung während der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. K.-R. Trott zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. J. Kummermehr danke ich recht herzlich für die wissenschaftliche Betreuung und die Gelegenheit zu ausführlicher Diskussion beim Entstehen dieser Arbeit. Ebenso danke ich den Assistentinnen des Strahlenbiologischen Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und gewährte Anleitung bei der praktischen Versuchsdurchführung.

Die Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg hat in großzügiger Weise durch die Bereitstellung der Tiere und des Versuchsmaterials die Ausführung der Experimente ermöglicht.

1.	Einleitung	1
2.	Die Bedeutung der Kunst	2
3.	Die Kunst der Vergangenheit	3
4.	Die Kunst der Gegenwart	4
5.	Die Kunst der Zukunft	5
6.	Die Kunst der Gegenwart	6
7.	Die Kunst der Gegenwart	7
8.	Die Kunst der Gegenwart	8
9.	Die Kunst der Gegenwart	9
10.	Die Kunst der Gegenwart	10
11.	Die Kunst der Gegenwart	11
12.	Die Kunst der Gegenwart	12
13.	Die Kunst der Gegenwart	13
14.	Die Kunst der Gegenwart	14
15.	Die Kunst der Gegenwart	15
16.	Die Kunst der Gegenwart	16
17.	Die Kunst der Gegenwart	17
18.	Die Kunst der Gegenwart	18
19.	Die Kunst der Gegenwart	19
20.	Die Kunst der Gegenwart	20
21.	Die Kunst der Gegenwart	21
22.	Die Kunst der Gegenwart	22
23.	Die Kunst der Gegenwart	23
24.	Die Kunst der Gegenwart	24
25.	Die Kunst der Gegenwart	25
26.	Die Kunst der Gegenwart	26
27.	Die Kunst der Gegenwart	27
28.	Die Kunst der Gegenwart	28
29.	Die Kunst der Gegenwart	29
30.	Die Kunst der Gegenwart	30
31.	Die Kunst der Gegenwart	31
32.	Die Kunst der Gegenwart	32
33.	Die Kunst der Gegenwart	33
34.	Die Kunst der Gegenwart	34
35.	Die Kunst der Gegenwart	35
36.	Die Kunst der Gegenwart	36
37.	Die Kunst der Gegenwart	37
38.	Die Kunst der Gegenwart	38
39.	Die Kunst der Gegenwart	39
40.	Die Kunst der Gegenwart	40
41.	Die Kunst der Gegenwart	41
42.	Die Kunst der Gegenwart	42
43.	Die Kunst der Gegenwart	43
44.	Die Kunst der Gegenwart	44
45.	Die Kunst der Gegenwart	45
46.	Die Kunst der Gegenwart	46
47.	Die Kunst der Gegenwart	47
48.	Die Kunst der Gegenwart	48
49.	Die Kunst der Gegenwart	49
50.	Die Kunst der Gegenwart	50

Gewidmet meiner Frau Anneliese.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material, Versuchsanordnung, Methoden	3
2.1. Tumorentstehung	3
2.2. Tiermaterial	3
2.3. Transplantation der Tumoren	3
2.4. Messung der TumorgroÙe	5
2.5. Kriterien für die Auswahl der Tumoren	6
2.6. Bestrahlung der Tumoren	6
2.6.1. Bestrahlungsaufbau	6
2.6.2. Dosimetrie	8
2.7. Versuchsaufbau	9
2.8. Graphische Auswertung von Tumorwachstumskurven	11
2.9. Auswertung der kurativen Experimente	12
2.10. Autoradiographische Bestimmung des Markierungsindex	13
3. Ergebnisse	14
3.1. Serielle Passagierung und Wachstumsverhalten	14
3.2. Einfluß der Anoxie	16
3.3. Histologie	17
3.3.1. Primärtumor	18
3.3.2. Spätere Passagen	21
3.3.3. Bestrahlungsrezidive	22
3.3.4. Strahleninduzierte Zweittumoren	26
3.4. Markierungsindex im unbestrahlten Tumor	28
3.5. Wachstumsverhalten nach Bestrahlung	30

3.6.	Dosisabhängigkeit der Rezidivwachstumsrate	33
3.7.	Quantifizierung der Wachstumsverzögerung	35
3.8.	Sauerstoffverstärkungsfaktor	40
3.9.	Heilungsexperiment	41
3.9.1.	Dosisabhängigkeit der Heilung	43
4.	Diskussion	49
4.1.	Wachstumsverhalten des unbehandelten Tumors	49
4.2.	Ergebnisse der Wachstumsverzögerung	55
4.3.	Dosisabhängigkeit der Tumorheilung	59
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	68
7.	Lebenslauf	73

1. Einleitung

Das Nierenkarzinom, von dem Männer etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen, hat einen Altersgipfel zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr und macht bei Männern 1,7 % aller bösartigen Tumoren aus. Der mit 80 bis 85 % am häufigsten vorkommende Nierentumor ist das Adenokarzinom der Niere.

Die Histologie zeigt meist Tumoren aus besonders gut ausdifferenzierten Zellen mit hellem, oft pflanzenzellartigem Zytoplasma, das lipoid- und glykogenreich ist. Die Tumorzellen sind trabekelartig, tubulär oder papillomatös angeordnet. Sie werden von einem dichten Netz kapillärer Gefäße umgeben. Makroskopisch bietet sich ein buntes Bild.

Die grundsätzliche Behandlung der Nierenmalignome des Menschen besteht in der radikalen Nephrektomie, das heißt Entfernung der Niere mitsamt Nebenniere, Harnleiter, Fettkapsel und regionalen Lymphknoten. Die postoperative Hochvoltbestrahlung mit 30 bis 40 Gy Herdbestrahlung ist heute in zahlreichen Fällen eine wertvolle Ergänzung des operativen Vorgehens.

Die Diskussion über die präoperative Hochvoltbestrahlung mit 15 bis 20 Gy Herddosis ist noch nicht abgeschlossen. Die Vorteile der Kurzzeitvorbestrahlung liegen in der Devitalisierung der Tumorzellen und damit in der verminderten Gefahr einer intraoperativen Tumorzellstreuung (13,17).

Die Fragen des optimalen strahlentherapeutischen Vorgehens, insbesondere auch der Dosierung und Fraktionierung werden weiterhin kontrovers diskutiert. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit von Nierenkarzinomen sind deshalb von klinischem Interesse.

Für die experimentelle Bearbeitung gilt ebenso wie bei anderen Tumorformen, daß die klinische Ausbreitungsform und das Metastasierungsmuster kaum in ein Tiermodell übersetzbar sind, daß jedoch andere tumorbiologische Eigenschaften wie beispielsweise die zelluläre Strahlenempfindlichkeit in geeigneten Transplantationstumoren sinnvoll untersucht werden können. In dieser Hinsicht sind bisher vorliegende Ergebnisse interessant, die für ein Ureterkarzinom der Ratte eine hohe Strahlenresistenz belegen (1). Daten über transplantable Nierenkarzinome selbst sind bisher nicht veröffentlicht worden, wie überhaupt - von chemisch induzierten Tumoren abgesehen - Nierenkarzinome beim Nager als experimentelle Tumorsysteme selten beschrieben wurden (19). Es schien uns daher von Interesse, ein spontan entstandenes in seiner Histologie dem menschlichen hypernephroiden Adenokarzinom nahestehendes Nierenkarzinom der Maus strahlenbiologisch in wesentlichen Grundzügen zu charakterisieren.

2. Material, Versuchsanordnung, Methoden

2.1. Tumorentstehung

Das Karzinom AT 14 wurde bei der routinemäßigen Autopsie einer NMRI-Maus entdeckt, die 20 Monate vorher in der rechten Flanke zur Behandlung eines transplantablen Melanoms mit einer Einzeitdosis von 40 Gy bestrahlt worden war.

Bei der Sektion des vergrößerten Abdomens waren beide Nieren von weißlichem Tumorgewebe durchsetzt, etwa auf das Doppelte vergrößert mit höckeriger Oberfläche. Der Schnellschnitt ergab karzinomartige Zellverbände von großen, eosinophilen, plasmareichen Zellen mit runden Kernen, tubulusähnliche Formationen bildend. Zu weiteren Untersuchungen wurde ein Teil des Tumors weitertransplantiert, der andere Teil wurde in flüssigem Stickstoff konserviert.

2.2. Tiermaterial

Die Versuche wurden an männlichen Albinomäusen vom Stamm NMRI - Neuherberg, also am isogenen Tierstamm durchgeführt. Die Tiere wurden mit Altromin und Wasser ernährt. Bei der Transplantation waren die Tiere 8 bis 10 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 35 bis 40 Gramm erreicht.

2.3. Transplantation der Tumoren

Als Spender wurden Mäuse ausgesucht, deren weiter-

passagierte Tumoren keine größere Abweichung vom mittleren Wachstum der Kontrollgruppen aufwiesen. Die Größe der Tumoren bei der Transplantation betrug im allgemeinen zwischen 250 und 500 mg.

Der Tumor der Spendermaus wurde nach Tötung des Tieres durch Äther sofort in 0,9 % NaCl-Lösung gebracht. Danach wurde er von dem umgebenden Bindegewebe und von Nekroseteilen befreit. Anschließend wurde das vital erscheinende Tumorparenchym mit Hilfe einer Rasierklinge und einer Pänzette unter sterilen Bedingungen in Stückchen von ca. 1 - 2 mm Kantenlänge zerlegt, was einer Zellzahl von 10^5 - 10^6 Tumorzellen entspricht.

Das Empfängertier wurde mit Di-äthyl-äther narkotisiert und die Hautfläche für die nachfolgende Inzision mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert, nachdem zuvor das Fell an dieser Stelle geschoren wurde.

Die Tumorstückchen wurden in einen Trokar eingeführt. Danach wurde in die dorsale, rechte Thoraxseite eine Hautinzision vorgenommen. Der Trokar wurde subkutan eingeführt, bis caudal der Scapula vorgeschoben und das Tumorstück deponiert. Die Lage über dem Thorax erlaubt eine weitgehend tangentielle Bestrahlung und erleichtert wegen der harten Unterlage die spätere Messung der Tumorgroße.

Mit einem Locher wurde die Empfängermaus an den Ohren nach einem numerischen Code unverwechselbar markiert. Die Transplantation einer Tumorpassage wurde stets innerhalb von 30 bis 40 Minuten nach Tötung der Spendermaus abgeschlossen.

Die Bestrahlungsversuche über einen längeren Zeitraum erforderten steigende Passagezahlen. Es wurde zum Teil wieder auf ältere, noch vorhandene Spendertumoren zurückgegriffen.

Der ursprüngliche Nierentumor wurde außerdem in flüssigem Stickstoff konserviert. Gegen Ende der Untersuchungen wurde tiefgefrorenes Tumorgewebe aufgetaut, implantiert und über einige Passagen das Wachstum unbehandelter Tumoren verfolgt, um die Übereinstimmung mit den unmittelbar weitertransplantierten Passagen zu überprüfen.

2.4. Messung der Tumorgroße

Ungefähr 10 Tage nach Implantation war bei etwa 80 % der Tiere subkutan ein kleiner Tumorknoten palpabel. Wenn er nach 3 Wochen ein Gewicht von etwa 50 mg erreicht hatte, wurde seine Größe jeden dritten oder vierten Tag gemessen. Dazu wurde eine bandartige Plexiglasschablone verwendet, die kreisrunde Löcher mit zunehmendem Durchmesser enthielt. Jeder Durchmesser entsprach einem bestimmten Tumorgewicht, was durch bereits vorliegende Kalibrierungsmessungen bestimmt worden war. Die Bohrung, die vom Tumor genau ausgefüllt wurde, gab das entsprechende Tumorgewicht an.

2.5. Kriterien für die Auswahl der Tumoren

- a) Der Tumor mußte im subkutanen Raum gut verschieblich sein. Da die Bestimmung des Bestrahlungseffekts von der zuverlässigen Größenmessung der Tumoren abhängt, durfte der Tumor weder mit der Haut noch mit dem darunterliegenden Gewebe verwachsen sein. Verwachsungen mit der Haut führten im weiteren Wachstumsverlauf besonders nach Bestrahlung meist zu Ulceration. Die Verschieblichkeit gegenüber der Unterlage ist für die Abklemmung der unter anoxischen Bedingungen bestrahlten Tumoren wichtig.
- b) Der Tumor mußte annähernd sphäroide Form für die Messung haben, um die Meßfehler möglichst klein zu halten.
- c) Um standardisierte Wachstumsbedingungen einzuhalten, wurden Tumoren mit sehr kurzer Latenzzeit ausgeschlossen. Insgesamt konnten unter Berücksichtigung dieser Kriterien 50 % der transplantierten Tumoren für die Bestrahlung verwendet werden. Die Tumoren hatten bei Bestrahlung eine Größe zwischen 80 und 120 mg.

2.6. Bestrahlung der Tumoren

2.6.1. Bestrahlungsaufbau

Die Tumorbestrahlung erfolgte mit einer Müller MG 300 Röntgenanlage bei einer Röhrenspannung

von 300 kV und einem maximalen Röhrenstrom von 10 mA. Die Dosisleistung betrug dabei im Focus-Hautabstand von 20 cm etwa 4,3 Gy/min. Zur Filterung wurden 0,5 mm Cu und 1,0 mm Al verwendet.

Das Strahlenbündel wurde durch einen Messing-Tubus mit zweifacher Kollimierung durch Bleiblen den auf ein nutzbares Feld von 26 mm ausgeblendet. Die durch Filmdosimetrie vermessene Inhomogenität im Feld betrug weniger als $\pm 5\%$.

Den zu bestrahlenden Tieren wurden 0,28 ml einer 2 %-igen Na-Hexobarbitallösung (Evipan^R) intraperitoneal als Narkosemittel injiziert. Die Narkose trat nach etwa 5 Minuten ein. Mit Klebestreifen wurden die Tiere auf höhenverstellbaren Ständern fixiert und der Tumor dann genau in die Mitte des Bestrahlungsfeldes auf die Höhe der Tubusunterkante justiert.

Auf diese Weise wurde das angrenzende Gewebe soweit wie möglich von der direkten Strahlung ferngehalten.

Für einen Teil der Versuche wurden die Tumoren unter anoxischen Bedingungen bestrahlt. Dazu wurden die Tumoren mit einer verschraubbaren Plastikzange von der Blutzufuhr für 30 Minuten abgeklemmt. Um sicher zu gehen, daß im Tumor anoxische Verhältnisse vorlagen, wurde diese Ischämie in jedem Fall mindestens 5 Minuten vor der Bestrahlung begonnen.

Nach der Bestrahlung traten nach etwa einer Woche dosisabhängige Hautveränderungen auf wie Erythem, trockene Schuppung und Epilation. Nach

Dosen über 25 bis 30 Gy trat auch regelmäßig eine feuchte Desquamation nach etwa 3 Wochen auf. Diese akute Strahlenreaktion heilte stets im Verlauf weniger Wochen ab. Nach hohen Dosen kam es im späteren Verlauf nicht selten zu einer fibrotischen Veränderung der Haut.

Nach der Bestrahlung wurden die Tumoren 2 - 3-mal wöchentlich gemessen. Bei höheren Dosen (s.o.) wurde die Messung durch die akute Hautreaktion erschwert, doch fiel diese stets in den Zeitraum der Tumorregression und nicht des Rezidivwachstums. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte nach hohen Dosen die Messung durch die fibrotischen Veränderungen in der Haut, aber auch durch flächenhaftes Wachstum des Rezidivs erschwert sein.

Hatte das Tumorrezidiv eine Meßgröße zwischen 500 und 700 mg erreicht, wurde das Tier mit Chlороform getötet, der Tumor wurde herauspräpariert und gewogen. Ein Teil der Tumoren, darunter nahezu alle Rezidive nach dem 5. Monat, wurde fixiert und nach Einbettung in Methylmethacrylat histologisch untersucht.

Eine kleine Anzahl von Tumoren konnte nicht ausgewertet werden, da sie frühzeitig, d.h. noch in der Regressionsphase, ulzerierten und die Tiere abgetötet wurden.

2.6.2. Dosimetrie

Für einen in sich abgeschlossenen Teil des Bestrahlungsexperiments (Dosisabhängigkeit der Wachstumsverzögerung) wurde ein Radocon-Dosimeter

verwendet, das ein Monitoring der eingestrahlten Dosis mit Hilfe einer Victoreen - Ionisationskammer erlaubte, die durch einen Seitentubus in den Strahlengang über dem Tumor gebracht war.

Das Experiment zur Ermittlung der Dosisabhängigkeit der Tumorheilung mußte aus organisatorischen Gründen an einer anderen - jedoch identischen - Röntgenanlage durchgeführt werden. Die Dosimetrie während der Bestrahlung erfolgte in diesem Fall bei gleicher Geometrie mit einer Therapiekammer und einem Simplexdosimeter der Fa. Phywe, Freiburg.

2.7. Versuchsaufbau

Die Mehrzahl der Versuchstiere für die Bestrahlungsexperimente und die parallel geführten Kontrollgruppen wurden den Passagen 4 bis 7 entnommen.

Folgende größere Versuchsgruppen wurden gebildet:

A: Unbestrahlte Kontrollgruppe zur Untersuchung des unbeeinflussten Tumorwachstums.

Anzahl der Tiere: 13

B: Unbestrahlte Kontrollgruppe, deren Tumoren einer 30-minütigen Ischämie durch Abklemmen unterworfen wurden. Damit sollte für die Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen geklärt werden, ob bereits die 30-minütige Anoxie das Tumorwachstum beeinflusst.

Anzahl der Tiere: 14

C: Einzeitbestrahlung

1. Subkurative Bestrahlung

a) Bestrahlung in Luft (ambient)

	Anzahl der Tiere	Dosis in Gy
1. Gruppe:	12	5
2. Gruppe:	12	10
3. Gruppe:	12	15
4. Gruppe:	12	20
5. Gruppe:	12	25

b) Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen

	Anzahl der Tiere	Dosis in Gy
1. Gruppe:	12	10
2. Gruppe:	12	15
3. Gruppe:	12	20
4. Gruppe:	12	25
5. Gruppe:	10	30
6. Gruppe:	12	35

2. Kurative Bestrahlung

a) Bestrahlung in Luft (ambient)

	Anzahl der Tiere	Dosis in Gy
1. Gruppe:	8	30
2. Gruppe:	8	35
3. Gruppe:	8	40
4. Gruppe:	9	45
5. Gruppe:	8	51
6. Gruppe:	8	58

b) Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen

	Anzahl der Tiere	Dosis in Gy
1. Gruppe:	8	40
2. Gruppe:	8	45
3. Gruppe:	8	51
4. Gruppe:	10	58
5. Gruppe:	8	66
6. Gruppe:	8	75

2.8. Graphische Auswertung von Tumorwachstumskurven

Für alle Tumoren des Wachstums-Experiments wurde der Größenverlauf nach Bestrahlung durch Zeichnen einer individuellen Wachstumskurve im halblogarithmischen Maßstab graphisch festgehalten. Nach Normieren der Einzelkurven auf die Behandlungsgröße (= 100 %) wurden für die einzelnen Dosisgruppen Mittelwertskurven nach folgenden beiden Verfahren erstellt:

- a) Es wurde das geometrische Mittel des Gewichts als Funktion der Zeit bestimmt. Dieser Modus wurde dort verwendet, wo der Gewichtsverlauf nicht stetig war, also in den ersten Tagen oder Wochen der Bestrahlung.
- b) Es wurde das geometrische Mittel der Latenzzeit zum Erreichen vorgegebener Größen bestimmt. Hier wurde sozusagen die Latenzzeit als Funktion der Tumorgroße aufgetragen.
Die Vorteile dieses Modus sind einmal, daß alle Tumoren in einer Mittelwertskurve erfaßt werden können, auch dann, wenn Rezidive zeitlich in ihrem Auftreten stark streuen. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Neigung der Mittelwertskurve die tatsächliche mittlere Neigung der einzelnen Wachstumskurven wiedergibt.
Im Gegensatz hierzu wird in Gewichts-Mittelwertskurven (Verfahren a) die Neigung systematisch zu flach dargestellt. Ein weiterer Vorteil besteht schließlich darin, daß die Mittelwerte und ihre Standardabweichung

(= Standard Error) bereits die als Wachstumsverzögerung bezeichnete Meßgröße darstellen.

2.9. Auswertung der kurativen Experimente

In den potentiell kurativen Dosisgruppen wurde prinzipiell der Größenverlauf ebenso verfolgt und zeichnerisch dokumentiert wie für die subkurativen Gruppen beschrieben.

Nach höheren Dosen ergab sich dabei oft weitgehende Remission bis auf einen eben noch palpablen Resttumor. Alle Tumoren wurden über 12 Monate noch in wöchentlichem Abstand kontrolliert und das Auftreten von Lokalrezidiven festgehalten und verfolgt. Ihre Feststellung machte keine Schwierigkeiten, da es sich stets um progressiv wachsende Tumoren handelte.

Nach dem 5. Monat auftretende Rezidive wurden in der Regel auch histologisch untersucht. Dabei ergaben sich 2 Fälle, die aufgrund ihrer Morphologie eindeutig als strahleninduzierte Tumoren eingeordnet werden mußten.

Da die Ereignisse "strahleninduzierter Tumor" und "Tod ohne Rezidiv" konkurrierend zum Ereignis "Rezidiv" auftreten, wurde die Heilungsrate ähnlich dem Kaplan-Meier'schen Verfahren berechnet (35). Im Prinzip wurden dabei die vor dem Ablauf der vorgesehenen Beobachtungszeit ohne Rezidiv ausscheidenden Tiere mit der Rezidivwahrscheinlichkeit der endgültig beobachteten Tiere belastet und gewertet.

2.10. Autoradiographische Bestimmung des Markierungsindex

Einer Gruppe von 4 Tieren aus der Passage 4 wurden nach Erreichen von durchschnittlich 100 mg Tumorgewicht 0,01 ml/g Körpergewicht Tritium-Thymidinlösung intraperitoneal injiziert. Das Tritium-Thymidin hatte in der verwendeten Lösung eine Aktivität von 200 μ Ci/ml (spezifische Aktivität 2 - 5 Ci/mMol). Damit wird erreicht, daß die proliferierenden Tumorzellen, die sich während der Verfügbarkheitszeit des ^3H -TdR (ca. 30 - 45 min.) in der S-Phase befinden, radioaktiv markiert werden.

Eine Stunde nach Injektion wurden die Tiere getötet, die Tumoren in Alkohol-Formol-Lösung fixiert und danach in Methacrylat eingebettet.

Anschließend wurden von jedem Tumor 5 μ dicke Schnitte angefertigt und mit Kodak NTB 2-Emulsion autoradiographiert. Nach 3-wöchiger Exposition wurden die Präparate entwickelt, mit Hämalaun und Eosin gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Aus dem Prozentsatz markierter Zellen zur Gesamtzahl von gezählten Tumorzellen wurde der Markierungsindex (LI) ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Serielle Passagierung und Wachstumsverhalten

In der ersten und zweiten Passage zeigte der Tumor häufig Unstetigkeiten im Wachstum, die auch vorübergehende Regression einschlossen. Dabei traten bei vielen Tumoren Zysten auf. Das Erreichen eines Tumorgewichts von 100 mg dauerte bis zu 100 Tage nach der Transplantation.

Von der 3. Passage an wurde zystisches Wachstum nur noch vereinzelt beobachtet. Die histologische Untersuchung zeigte einen weitgehend parenchymatösen Aufbau des Tumors.

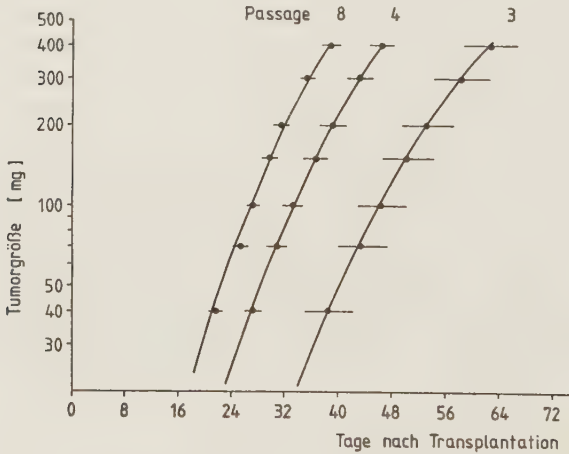


Abb. 1: Gemittelte Wachstumskurven von unbestrahlten Tumoren aus 3 Passagen. Die Streuungen stellen den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM) dar.

Einen Überblick über das Wachstumsverhalten in den einzelnen Passagen gibt Abbildung 1, die Mittelwertskurven von unbehandelten Tumoren der Passagen 3, 4 und 8 enthält.

Die Kurven zeigen mit steigender Passagierung eine Verkürzung der Latenzzeit zum Erreichen von 100 mg, gleichzeitig nimmt auch die Wachstumsgeschwindigkeit zu. Diese Effekte sind allerdings nicht stetig von Passage zu Passage zunehmend.

In den folgenden Tabellen I und II werden entsprechende Zahlenwerte gegeben:

Passage	$T_{100}(d)$	$\bar{x} \pm S.E.$
3	46,9	(43,4 ... 50,4)
4	33,5	(31,8 ... 35,0)
5	43,4	(39,9 ... 46,9)
7	35,0	(32,2 ... 38,5)
8	26,9	(26,4 ... 28,3)
9	32,9	(31,5 ... 35,0)

Tabelle I Latenzzeit zum Erreichen von 100 mg Tumorgroße in verschiedenen unbehandelten Passagen. T_{100} gibt den geometrischen Mittelwert an.

Greift man die Verdopplungszeiten aus den Mittelwertskurven ab, in diesem Fall durch Punkteverbindung, so ergeben sich folgende Werte (Tage):

Passage	$T_{70/140}$	$T_{150/300}$	$T_{200/400}$
3	7,0	8,2	9,2
4	5,2	6,6	7,3
8	4,8	5,7	7,0
9	3,0	5,1	4,3

Tabelle II Verdopplungszeit zu verschiedenen Tumorgößen in unbehandelten Passagen.

Im Übrigen weisen alle Kurven das gemeinsame Merkmal auf, daß mit steigender Größe die Wachstumsrate abnimmt.

3.2. Einfluß der Anoxie

Für die Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen wurden die Tumoren während des Behandlungsvorganges von der Blutzufuhr abgeklemmt. Um eventuelle Einflüsse auf das spätere Wachstum zu erkennen, wurden zwei prospektive Gruppen mit je 14 Mäusen gebildet, von denen die Tumoren der einen Gruppe bei Erreichen der Bestrahlungsgröße von 80 - 130 mg für 30 Minuten mit Hilfe einer Plastikklammer umgriffen und abgeklemmt wurden. Für diesen Versuch wurden je 7 Tiere aus den Passagen 5 und 7 verwendet.

Eine Darstellung beider Wachstumskurven findet sich in Abbildung 2.

Die Tumorverdopplungszeit $T_{D200/400}$ der Tumoren betrug für die unbehandelte Gruppe 10,4 (9,8 - 11,0) Tage. Für die abgeklemmten Tumoren betrug die $T_{D200/400}$ 10,3 (9,4 - 11,2) Tage.

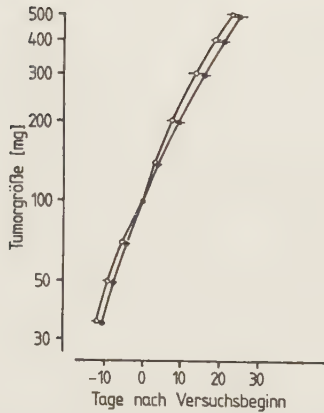


Abb. 2: Normierte mittlere Wachstumskurven von unbehandelten Tumoren (o) bzw. nach 30-minütiger Ischämie (●) am Tag 0.

Es ist also kein signifikanter Einfluß der Anoxie auf das Tumorwachstum zu beobachten. Gleichzeitig kann man dadurch auch einen Einfluß des Narkosemittels Hexobarbital, mit dem die Tiere während der Abklemmzeit ruhig gestellt wurden, auf das Wachstum ausschließen.

3.3. Histologie

Nachfolgend wird eine histologische Beschreibung des ursprünglichen Tumors, von späteren Passagen, sowie beispielhaft für einzelne Bestrahlungszidive gegeben.

3.3.1. Primärtumor

Bei dem spontan gewachsenen Nierenkarzinom handelt es sich um einen kugelförmigen etwa 500 mg großen Tumor, aus mehreren untereinander konfluierenden Einzelknollen bestehend, dazwischen noch einige schmale Septen und zwickelartige Reste von ursprünglichem Nierenparenchym mit Glomeruli und unterschiedlich weiten Tubuli. Die Einzelknollen des Tumors sind von recht unterschiedlichem Bau. Es herrschen tubuläre und trabekuläre Formationen vor, gebildet aus großen epithelartigen Zellelementen mit azidophilem Zytoplasma und unterschiedlich großen runden bis ovalen, vielfach auch eingekerbten Kernen mit großen Nukleoli (Abb. 3).

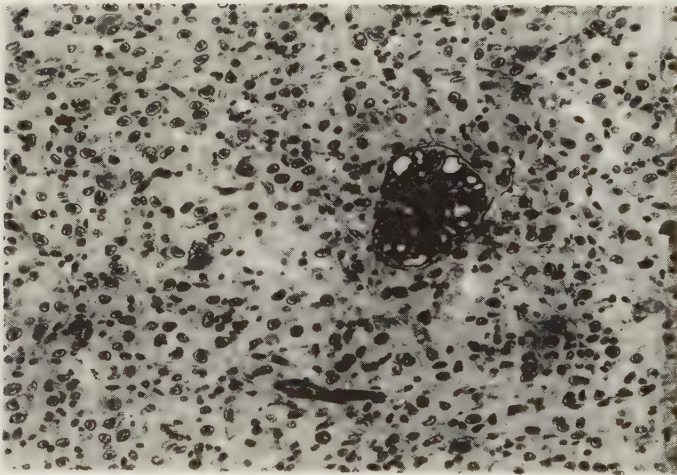


Abb. 3:

Primärtumor mit trabekulärem Bau und atypischem Glomerulum. PAS, x 240.

Die tubulären Formationen haben niedrige bis kubische Epithelauskleidung, das Zytoplasma ist auch hier azidophil, die Kerne ebenfalls rundlich bis oval. Es besteht eine gewisse Ähnlichkeit mit Hauptstückepithelien. Dazwischen befinden sich immer wieder kleine landkartenförmige Nekrosen. In einzelnen Tumorknollen sind auch papillär angeordnete Epithelien zu finden (Abb.4), in anderen wieder trabekulär gelagerte sehr große helle Zellen (Abb. 5). Die Mitosenrate ist niedrig. Am Tumorrand besteht regionär eine dichte lymphohistiocytäre Infiltration, offenbar als Ausdruck einer umschriebenen reaktiven Entzündung (Abb.6).

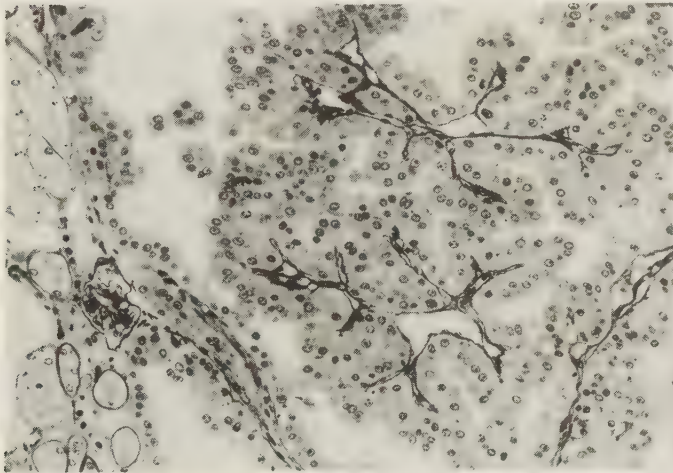


Abb. 4:

Papilläre Tumorzotten im Primärtumor, die an normale Nierenrinde angrenzen. PAS, x 240.

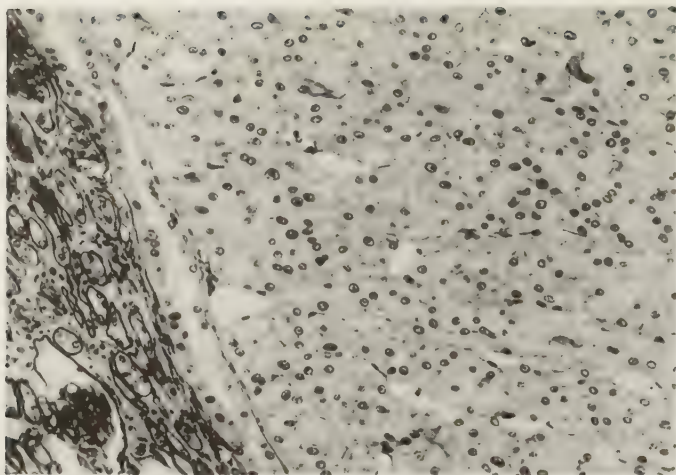


Abb. 5:

Trabekuläre Tumorzellverbände im Primärtumor mit relativ hellen Zellen. Am linken Bildrand komprimiertes Nierengewebe. PAS, x 240.

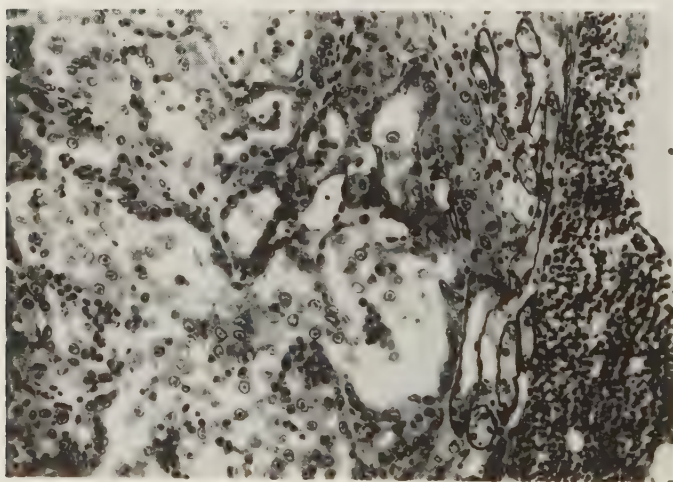


Abb. 6:

Primärtumor mit tubulär-zystischem Anteil, randständig mit lymphozytärem Infiltrat. PAS, x 240.

Es handelt sich demnach um ein hypernephroides Nierenkarzinom mit teils tubulärer, teils trabekulärer Differenzierung.

3.3.2. Spätere Passagen

Die Tumoren in späteren Passagen (von Passage 4 an) bieten ein weniger buntes Bild als der Primärtumor (Abb. 7).

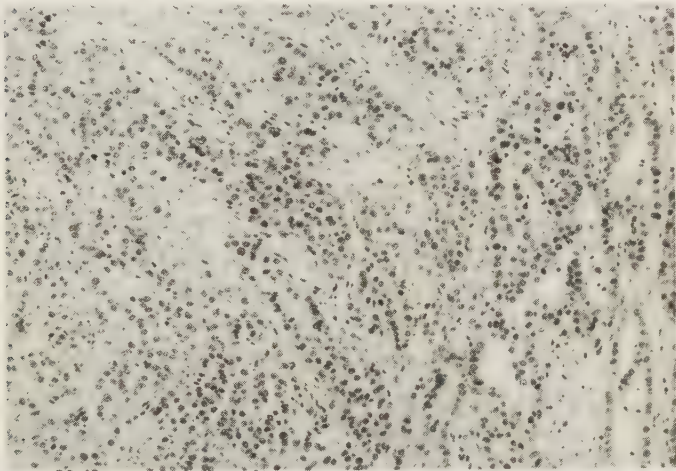


Abb. 7:

Unbehandelter Tumor aus der 9. Passage mit trabekulär - tubulärem Wachstum. HE, x 150.

Das Parenchym erscheint teils unstrukturiert, teilweise trabekulär oder tubulär gebaut; im Zentrum größerer Tumoren kommen zystische Auflockerungen vor, in die papilläre Zotten hineinragen. Der

Zelltyp ist einheitlicher als im Primärtumor, kubisch mit eosinophilem Plasma und rundem bis leicht ovalem Kern.

3.3.3. Bestrahlungsrezidive

Stellvertretend für die große Zahl von untersuchten Rezidivtumoren werden nachfolgend 3 typische Fälle beschrieben.

a) Rezidiv nach 20 Gy (unter anoxischen Bedingungen)

Es handelt sich um einen kugeligen Tumor von 12 mm Durchmesser, der in Fettgewebe, zum Teil auch in quergestreifte Muskulatur eingebettet ist. Der Tumor besitzt fast kein Stroma. Im histologischen Bild (Abb. 8) überwiegen trabekuläre Formationen, dazwischen kommen immer wieder unterschiedlich weite, zum Teil auch kleinzystische drüsenschlauchartige Formationen vor. Die mittelgroßen Tumorzellen haben breites azidophiles Plasma und vorwiegend rundliche Kerne mit großen, zum Teil mehrfachen Nukleoli. Es sind nur wenige Mitosen vorhanden. Im Tumorzentrum befinden sich einige pseudozystische Hohlräume mit reichlich Tumorzelldebris, vereinzelt auch kleine Nekroseinseln. Am Tumorrand sind wechselnd dichte Infiltrate aus Lymphozyten, Histiozyten und Plasmazellen, vereinzelt auch Granulozyten, eingelagert.

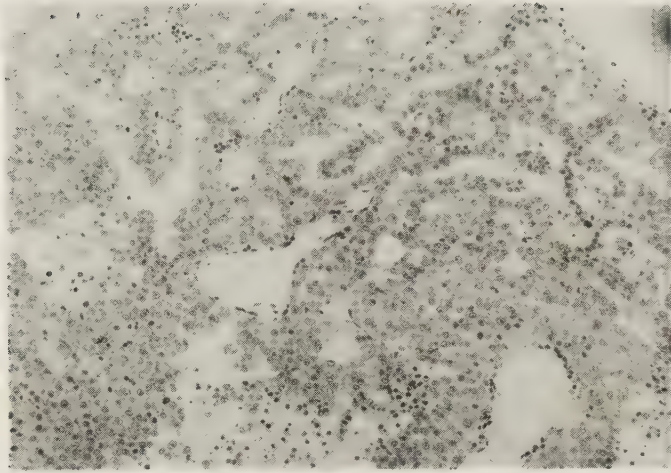


Abb. 8:

Tumorrezidiv nach 20 Gy anoxisch. Auflockerung durch große Sinusoide und zystische Degeneration im Tumorzentrum. HE, x 150.

b) Rezidiv nach 51 Gy (unter anoxischen Bedingungen)

Das histologische Bild (Abb. 9) zeigt einen relativ scharf begrenzten Tumor ohne eigentliche Kapsel. Die Einzelknollen sind vorwiegend medullär-trabekulär, teils auch tubulär strukturiert. Stroma ist nur ganz spärlich darin enthalten, oft sieht man extrazelluläres, feinkörniges bräunliches Pigment, offenbar Hämosiderin. Im Tumor befinden sich immer wieder kleinste Nekroseherde, noch keine eigentlichen Nekrosen. Die Mitoserate ist deutlich erhöht.

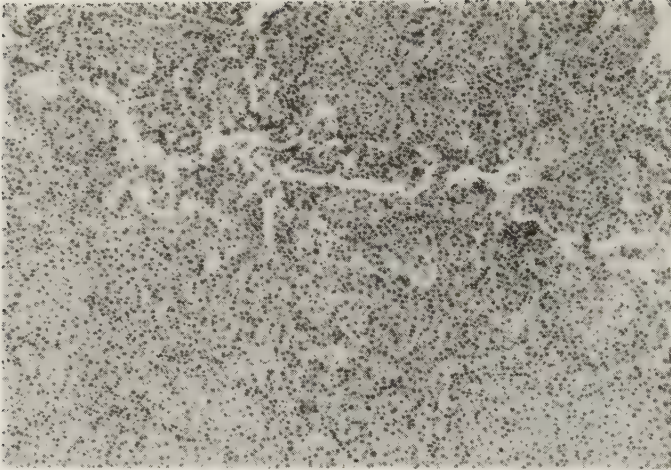


Abb. 9:

Tumorrezidiv nach 51 Gy anoxisch. Vorherrschend medullär-trabekulärer Bau, zum Teil auch tubuläre Differenzierung. HE, x 94.

c) Rezidiv nach 45 Gy (unter ambienten Bedingungen)

Es handelt sich um einen kugelförmigen Tumor von 8 mm Durchmesser, der in Fettgewebe lokalisiert ist (Abb. 10). Stellenweise ist eine ausgedehnte Kapselbildung zu erkennen. Stroma ist nur spärlich vorhanden. Der Tumor ist überwiegend trabekulär-tubulär strukturiert, im Zentrum kann man zystische Veränderungen und grobschollige Verkalkungen erkennen. Nur in den Randbezirken ist eine erhöhte Mitoserate zu erkennen.

Insgesamt läßt sich sagen, daß die Rezidive unabhängig von der Dosis und den Bestrahlungsbedingungen sich von den unbehandelten Tumoren

nicht wesentlich unterscheiden. Dies gilt sowohl für den Aufbau wie auch für das Zellbild, das auch nach höchsten Dosen kaum erhöhte Unregelmäßigkeiten oder Polymorphien erkennen läßt. Degenerative Veränderungen im Tumor, wie zystische Auflösung oder Massennekrose sind nur in geringem Umfang vorhanden.

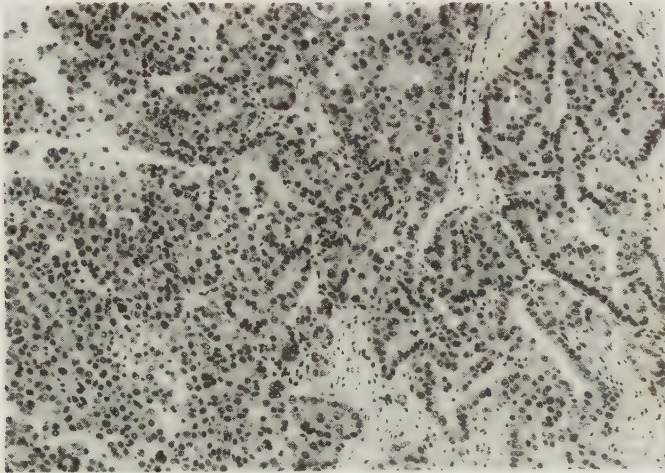


Abb. 10;

Tumorrezidiv nach 45 Gy ambient. Trabekulär-tubulärer Bau und zytologisches Bild wie im unbehandelten Tumor. HE, x 150.

3.3.4. Strahleninduzierte Zweittumoren

In 2 Fällen handelte es sich bei dem im Bestrahlungsfeld nach Remission auftretenden Tumor höchstwahrscheinlich nicht um ein echtes Rezidiv, sondern um einen strahleninduzierten Zweittumor.

- a) Tumor, 5,5 Monate nach Bestrahlung mit 51 Gy (ambient) auftretend

Es handelt sich um einen fast kugelförmigen Tumor ohne Kapsel von 13 mm Durchmesser (Abb.11).

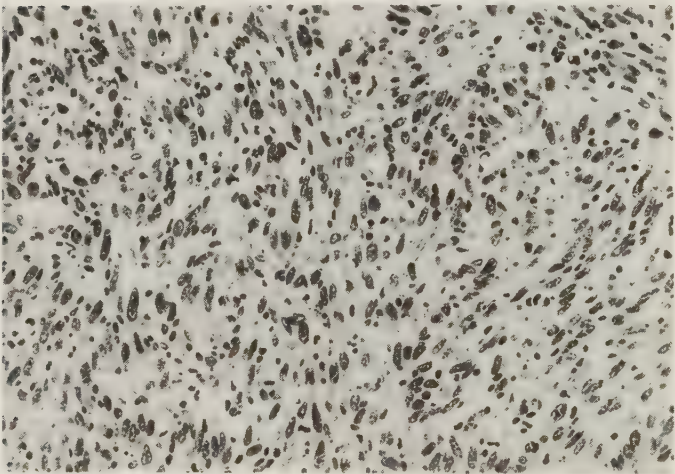


Abb. 11:

Strahleninduziertes Fibrosarkom(nach Behandlung mit 51 Gy ambient).Faszikuläre Züge aus spindelförmigen Zellen. Hoher Mitoseindex. HE, x 240.

Der sehr zellreiche Tumor ist faszikulär gebaut, die unterschiedlich breiten Bündel sind nach allen Richtungen des Raumes angeordnet. Sie durchflechten einander und bestehen aus relativ gleichförmigen spindelförmigen Zellen mit blaß-azidophilem Zytoplasma, die Kerne sind oft pyknotisch. Daneben sieht man aber auch sehr reichlich Mitosen. Riesenzellen und Riesenkernzellen fehlen weitgehend. Immer wieder sieht man kleinherdige, unscharf umgrenzte Nekrosen mit massenhaft Kerntrümmern.

Es handelt sich um ein zellreiches, höherdifferenziertes Spindelzellsarkom (offenbar Fibrosarkom), schnellwachsend und mit fokalen Nekrosen.

- b) Tumor, 9 Monate nach Bestrahlung mit 45 Gy (ambient) auftretend

Es handelt sich um einen Tumor von ca. 10 mm Durchmesser, der allseitig in das umgebende Fettgewebe beziehungsweise die Dermis einwächst und auch quergestreifte Muskulatur einbezogen hat (Abb. 12). Die schwach eosinophilen Zellen sind vorwiegend in sich durchflechtenden Bündeln angeordnet. Das Zellbild ist ähnlich dem oben beschriebenen Sarkom, wenn auch Riesenzellen und -kerne häufiger vorkommen. Die Mitoserate ist hoch. Es handelt sich hier ebenfalls um ein zellreiches, schnell proliferierendes Spindelzellsarkom.

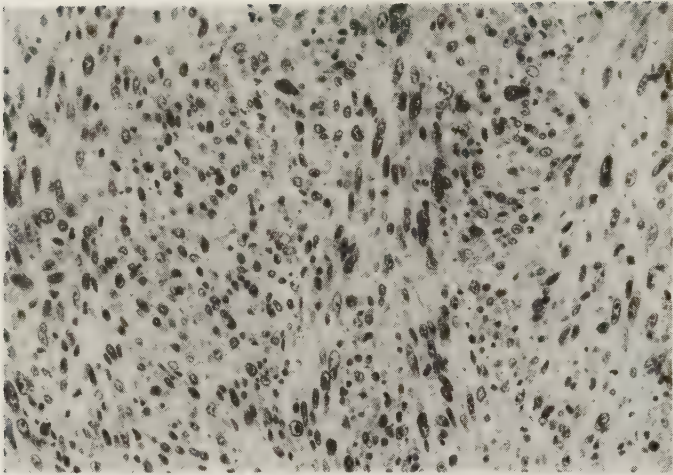


Abb. 12:

Strahleninduziertes Fibrosarkom (nach Behandlung mit 45 Gy ambient) mit ähnlicher Struktur wie der Tumor in Abb. 11. HE, $\times 240$.

3.4. Markierungsindex im unbestrahlten Tumor

In 4 unbehandelten Tumoren wurde der ^3H -Thymidin-Markierungsindex bestimmt. Die Abbildung 13 zeigt ein entsprechendes HE-gefärbtes Autoradiogramm. Für die Auswertung wurden durch den Tumorschnitt mit Hilfe eines Okularfadenkreuzes Schnittlinien gelegt. Der Abstand zwischen zwei Linien entsprach etwa 0,5 mm. Die Bestimmung erfolgt durch Auszählung aller von der Schnittlinie getroffenen Kerne, insgesamt etwa 900 - 1000 Zellen pro Präparat. Als markiert wurden Zellen betrachtet, die mindestens 3 - 5 Silberkörner über dem Zellkern hatten.

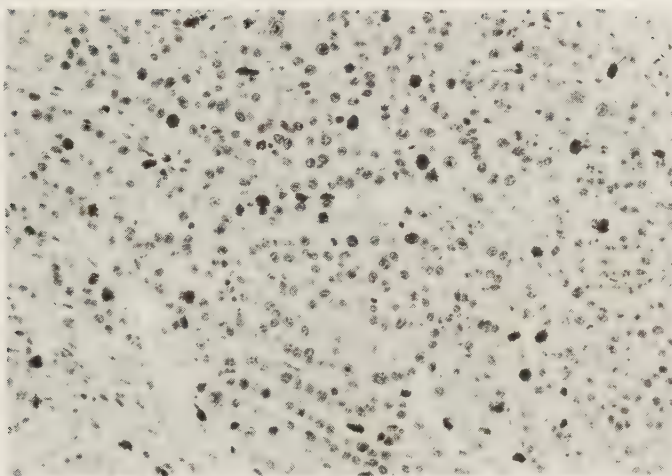


Abb. 13:

Autoradiogramm eines unbehandelten Tumors nach 3 H-TdR Pulsmarkierung. Relativ geringer Anteil markierter Tumorzellen. Oberhalb der Mitte befinden sich 2 markierte Endothelzellen. x 240.

Der Markierungsindex (LI) wurde als Quotient markierter Zellen / Gesamtzellen berechnet.

Tumor	<u>Markierte Zellen</u> <u>Gesamtzellen</u>	LI %
1	84/1156	7,3
2	98/1022	9,6
3	106/1025	10,3
4	79/1074	7,4
Mittelwert ($\pm$ SD)		8,98 $\pm$ 1,29

Tabelle III Markierungsindex in 4 unbehandelten Tumoren (Größe ca. 100 mg) nach 3H-TdR-Pulsmarkierung.

3.5. Wachstumsverhalten nach Bestrahlung

Abbildung 14 zeigt die gemittelten Wachstumskurven von Tumoren, die unter ambienten Bedingungen mit Einzeldosen zwischen 5 und 40 Gy bestrahlt und nachfolgend bis zum Erreichen der mindestens 5fachen Behandlungsgröße verfolgt wurden.

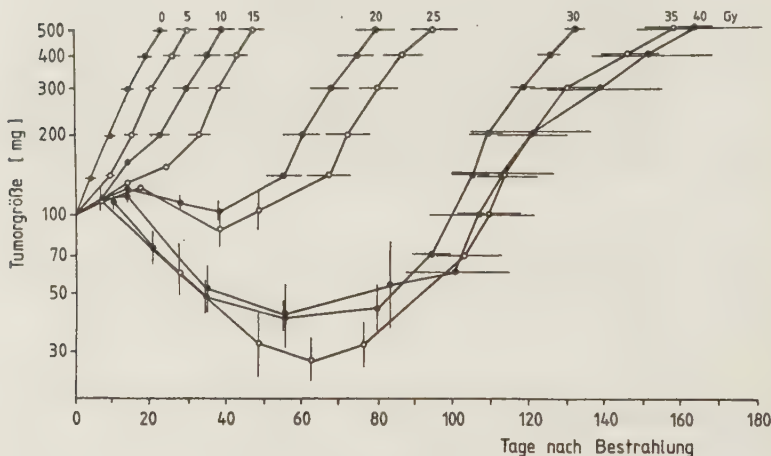


Abb. 14: Gemittelte Wachstumskurven nach Einzelzeitbestrahlung in Luft. Dosisangaben an den Kurven.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist das Volumenverhalten dosisabhängig. Die Tumoren wuchsen nach Dosen zwischen 5 und 15 Gy mit geringerer

Wachstumsgeschwindigkeit über 2 Wochen weiter, danach mit fast gleicher Geschwindigkeit wie die nicht bestrahlte Kontrollgruppe. Nach Strahledosen von 20 - 25 Gy war das Wachstum bis etwa zur 7. Woche stationär. Nach der Stagnation war beim weiteren Wachstum kein Unterschied zu den niedrigeren Dosen festzustellen, die Steigung der Kurven war annähernd gleich.

Nach Dosen von 30, 35 und 40 Gy kam es nach einer Latenzzeit von 1 - 2 Wochen zu einer Regression, bei der das Gewicht bis auf 30 mg abnahm. In einzelnen Fällen verschwand der Tumor zwischenzeitlich weitgehend oder fast völlig.

Nach der Regression wuchsen die Tumoren, die mit 30, 35 und 40 Gy bestrahlt wurden, wieder sehr rasch bis zum Erreichen eines Gewichts von 200 mg, sodaß sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte. Im weiteren Verlauf war die Wachstumsrate geringer, zumindest bei den mit 35 und 40 Gy bestrahlten Tumoren. Das Aufwachsen von 200 bis 500 mg Tumorgewicht dauerte bei der Kontrollgruppe etwa 16 Tage, bei den mit 40 Gy bestrahlten Tumoren ca. 6 Wochen.

Abbildung 15 zeigt das entsprechende Verhalten der unter anoxischen Bedingungen bestrahlten Tumoren. In diesem Fall begann das Wiedewachstum bei gleicher Strahlendosis wesentlich früher als bei den unter ambienten Bedingungen bestrahlten. Auch hier kam es nach Dosen von 40, 45, 51 und 58 Gy nach einer Latenzzeit von etwa 2 Wochen zu einer Regression, bei der das Gewicht bis auf

15 mg abnahm. Danach wuchsen die Tumoren bis etwa 200 mg rasch. Es gab keinen wesentlichen Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei den mit höheren Dosen bestrahlten Tumoren war im weiteren Verlauf die Wachstumsrate geringer als in der Kontrollgruppe, aber größer als bei den unter ambienten Bedingungen bestrahlten Tumoren.

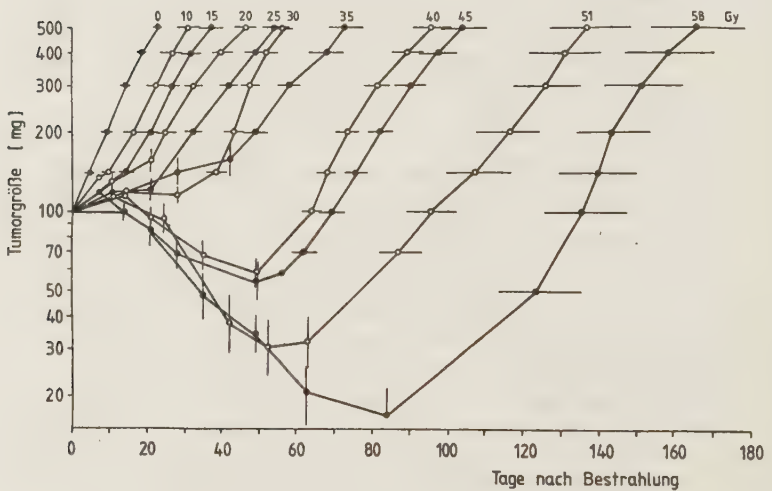


Abb. 15: Gemittelte Wachstumskurven nach Einzelbestrahlung unter anoxischen Bedingungen.

3.6. Dosisabhängigkeit der Rezidivwachstumsrate

Für die Quantifizierung der Wachstumsverzögerung, d.h. die Latenzzeit zum Erreichen einer vorgegebenen Rezidivgröße, kann eine dosisabhängige Retardierung der Wachstumsrate von erheblichem Einfluß sein. Die mittlere Rezidivwachstumsgeschwindigkeit wurde daher für alle Dosisgruppen für einen einheitlich auswertbaren Größenbereich von 200 bis 400 mg Rezidivgröße berechnet. Für die Verteilung der individuellen Verdopplungszeiten wurde wieder eine log-Normalverteilung zugrunde gelegt. Tabelle IV bringt eine Aufstellung dieser Werte, Abb. 16 eine graphische Darstellung.

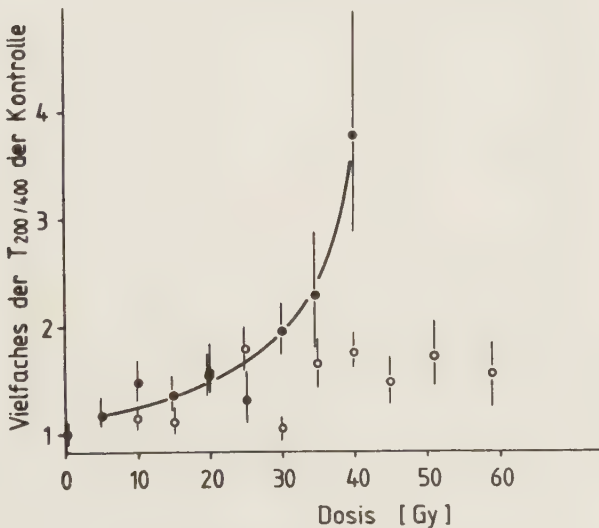


Abb. 16: Tumorverdopplungszeiten von 200 auf 400 mg aller Dosisgruppen.

Dosis ambient	$T_{D200/400}$ $\bar{X}$	(Tage) ($\bar{X} \pm S.E.$)
0 Gy	8,4	(7,6 - 9,4)
5 Gy	9,9	(8,7 - 11,3)
10 Gy	12,5	(11,0 - 14,1)
15 Gy	11,5	(10,3 - 13,0)
20 Gy	12,9	(11,4 - 14,7)
25 Gy	11,1	(9,2 - 13,2)
30 Gy	16,5	(14,6 - 18,7)
35 Gy	19,2	(15,2 - 24,3)
40 Gy	31,8	(24,4 - 41,4)

Dosis anoxisch	$\bar{X}$	($\bar{X} \pm S.E.$)
10 Gy	9,4	(8,5 - 10,5)
15 Gy	9,3	(7,8 - 11,1)
20 Gy	13,3	(11,5 - 15,5)
25 Gy	14,9	(13,3 - 16,8)
30 Gy	8,7	(8,0 - 9,6)
35 Gy	13,8	(11,5 - 15,7)
40 Gy	14,6	(13,2 - 16,2)
45 Gy	12,4	(10,7 - 14,4)
51 Gy	14,4	(12,2 - 17,1)
58 Gy	12,7	(10,5 - 15,4)

Tabelle IV Verdopplungszeiten (Wachstums-
dauer von 200 auf 400 mg) für
alle Dosisgruppen des Wachstums-
verzögerungs-Experiments.

Wie die Abbildung 16 zeigt, wird die Wachstumsrate im erfaßten Größenbereich nach höheren ambienten Dosen (30, 35 und 40 Gy) deutlich geringer. Bei den unter anoxischen Bedingungen bestrahlten Tumoren ist dieser Effekt weniger deutlich und nicht dosisabhängig. Die Wachstumsrate wird zunächst bis zu einer Dosis von 25 Gy geringer, bleibt dann aber bis etwa zur maximalen Bestrahlungsdosis von 58 Gy etwa konstant.

3.7. Quantifizierung der Wachstumsverzögerung

Als Wachstumsverzögerung (regrowth delay) wurde zunächst die Zeit definiert, die die Tumoren durchschnittlich benötigten, um ihr Bestrahlungsgewicht zu verfünffachen. Der hohe Endpoint mit Faktor 5 wurde gewählt, um initiale Wachstumschwankungen, die vor allem durch die mangelnde Schrumpfung nach niedriger Dosis entstehen, zu umgehen.

In der folgenden Tabelle V sind die Werte der Wachstumsverzögerung für alle ambienten und anoxischen Dosisgruppen aufgeführt. Die Werte stellen den geometrischen Mittelwert mit dem mittleren Fehler des Mittelwerts (Standard error of the mean) dar.

Die Analyse der Wachstumskurven in den einzelnen Dosisgruppen legte nahe, daß eine Beurteilung der Wachstumsverzögerung bei einem niedrigeren endpoint ebenfalls möglich ist und wegen Vermeidung späterer Wachstumsretardierung sogar Vorteile bietet.

Dosis ambient	Zeit zum Erreichen der 5fachen Ausgangsgröße (Tage)	
	$\bar{X}$	$(\bar{X} \pm \text{S.E.})$
0 Gy	23,0	(20,9 - 25,3)
5 Gy	30,5	(28,1 - 33,0)
10 Gy	39,6	(36,2 - 43,3)
15 Gy	44,2	(41,2 - 47,6)
20 Gy	81,9	(76,9 - 87,2)
25 Gy	103,6	(95,3 - 112,6)
30 Gy	131,6	(129,2 - 134,3)
35 Gy	148,8	(130,8 - 169,3)
40 Gy	154,7	(139,4 - 171,6)

Dosis anoxisch		
	$\bar{X}$	$(\bar{X} \pm \text{S.E.})$
10 Gy	33,2	(29,7 - 37,2)
15 Gy	37,6	(34,8 - 40,7)
20 Gy	47,2	(44,3 - 50,3)
25 Gy	54,6	(50,8 - 58,3)
30 Gy	59,7	(57,0 - 62,5)
35 Gy	73,0	(68,3 - 78,0)
40 Gy	100,5	(94,6 - 106,9)
45 Gy	107,4	(101,4 - 113,8)
51 Gy	142,7	(133,6 - 151,7)
58 Gy	171,8	(158,8 - 185,9)

Tabelle V Wachstumsverzögerung (insgesamt benötigte Zeit zum Erreichen der 5fachen Behandlungsgröße) für alle ambienten und anoxischen Dosisgruppen (Medianwert $\pm$ S.E.).

Die folgende Tabelle VI enthält eine Aufstellung der Wachstumsverzögerungen zum Erreichen der 2fachen Behandlungsgröße.

Dosis ambient	Zeit zum Erreichen der 2fachen Ausgangsgröße (Tage)	
	$\bar{X}$	$(\bar{X} \pm \text{S.E.})$
0 Gy	11,3	(9,1 - 14,2)
5 Gy	14,8	(13,6 - 16,2)
10 Gy	22,6	(19,9 - 25,6)
15 Gy	33,5	(30,6 - 36,6)
20 Gy	60,5	(55,9 - 65,4)
25 Gy	72,4	(66,8 - 78,5)
30 Gy	109,2	(104,8 - 113,8)
35 Gy	121,3	(112,3 - 131,0)
40 Gy	120,0	(105,4 - 136,6)

Dosis anoxisch		
	$\bar{X}$	$(\bar{X} \pm \text{S.E.})$
10 Gy	16,0	(13,9 - 18,4)
15 Gy	21,0	(19,3 - 22,9)
20 Gy	24,8	(22,7 - 27,3)
25 Gy	32,3	(30,1 - 34,5)
30 Gy	43,0	(40,8 - 45,2)
35 Gy	49,0	(46,0 - 52,1)
40 Gy	73,4	(70,4 - 76,4)
45 Gy	81,9	(78,5 - 85,5)
51 Gy	116,0	(107,8 - 124,8)
58 Gy	143,6	(134,3 - 153,6)

Tabelle VI Wachstumsverzögerung (insgesamt benötigte Zeit zum Erreichen der 2fachen Behandlungsgröße) für alle ambienten und anoxischen Dosisgruppen (Medianwert $\pm$ S.E.).

Wenn man die Wachstumsverzögerung in Abhängigkeit von der Dosis graphisch darstellt, so erhält man die entsprechenden Dosiseffektkurven. Für den Endpoint 5-fache Behandlungsgröße ergibt sich folgender Verlauf (Abb. 17):

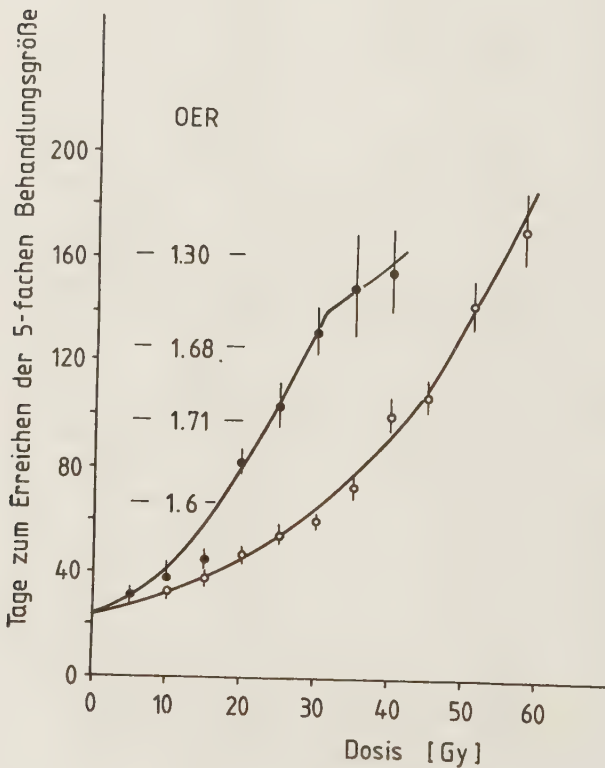


Abb. 17: Wachstumsverzögerung zum Erreichen der 5fachen Behandlungsgröße nach Einzeitbestrahlung in Luft und unter anoxischen Bedingungen.

Die Wachstumskurve für die ambient bestrahlten Tumoren steigt flach an und wird bis zu einer Dosis von etwa 30 Gy steiler. Sie knickt in diesem Dosisbereich um und steigt danach flacher an. Diese Kurve ist als biphasisch zu beschreiben (32).

Zum Vergleich ist die Kurve für die unter anoxischen Bedingungen bestrahlten Tumoren im Anfangsteil wesentlich flacher. Sie steigt monophasisch mit zunehmender Steilheit an. Die in Luft bestrahlten Tumoren haben also durchweg - bei gleicher Dosis - eine höhere Wachstumsverzögerung als die unter anoxischen Bedingungen bestrahlten Tumoren.

Der Vergleich der Wachstumskurven in Abbildung 14 und 15 zeigt, daß möglicherweise die Wahl einer Rezidivgröße von 200 mg einen besseren Endpoint darstellt. Bei dieser Größe haben Rezidive der niedrigeren Dosisgruppen ihre initiale Retardierung überwunden, während in den hohen Dosisgruppen noch keine nennenswerte Verlangsamung verzeichnet wird.

Abbildung 18 gibt die entsprechenden Dosiseffekt-kurven der Wachstumsverzögerung, das heißt der Latenzzeit zum Erreichen von 200 mg Rezidivgröße wieder. Die Unterschiede in der Kurvengestalt sind geringfügig. Die Dosispunkte nach 35 und 40 Gy ambient liegen relativ niedriger, weil die dosisabhängige Verlangsamung der Wachstumsrate (T_D 200/400) nicht mehr in die Wachstumsverzögerung eingeht.

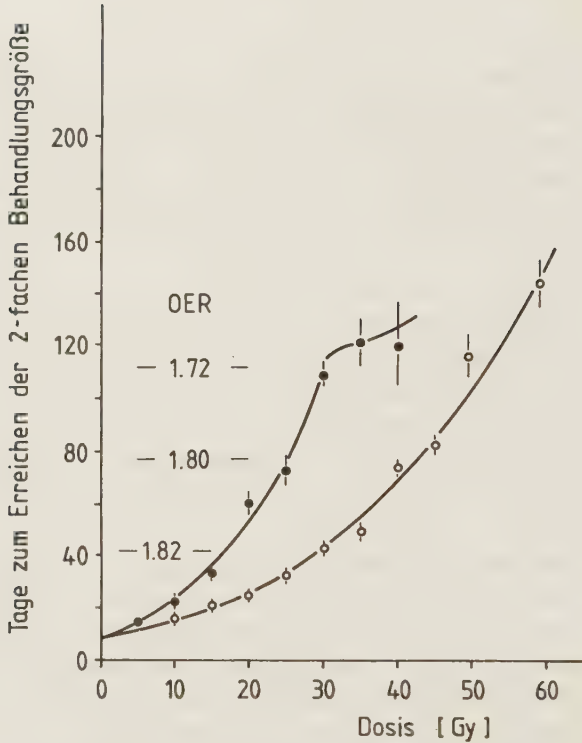


Abb. 18: Wachstumsverzögerung zum Erreichen der 2fachen Behandlungsgröße nach Einzeitbestrahlung in Luft und unter anoxischen Bedingungen.

3.8. Sauerstoffverstärkungsfaktor

Die Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung machen einen ausgeprägten Einfluß der Sauerstoffversorgung zum Zeitpunkt der Bestrahlung deutlich. Der Unterschied zwischen ambienter und anoxischer Bestrahlung kann wie für andere biologische Systeme

als Sauerstoffverstärkungsfaktor oder oxygen enhancement ratio (OER) ausgedrückt werden. Den OER erhält man (bei vorgegebenem Effektniveau) durch das Verhältnis isoeffektiver Dosen:

$$\frac{\text{Dosis anoxisch}}{\text{Dosis ambient}} = \text{O E R}$$

Aus den Dosiseffektkurven zum Erreichen der 5-fachen Ausgangsgröße (T_{5x}) leitet sich über den gesamten Verzögerungsbereich ein annähernd konstanter OER von 1,6 ab. Nach Erreichen des Kurvenknicks in der ambienten Kurve nimmt er rasch ab (Abb. 17).

Für die Dosiseffektkurve des niedriger gewählten Endpoints (T_{2x}) beträgt der OER im Anfangsteil 1,8 (Abb. 18).

3.9. Heilungsexperiment

Bei Überschreiten des subkurativen Dosisbereichs kommt es definitionsgemäß nicht nur zu einer temporären Remission, sondern dosisabhängig mit zunehmender Häufigkeit zu bleibender Rezidivfreiheit.

Im folgenden soll für die kurativen Dosisgruppen zunächst der Verlauf der Regression und anschließend die Dosisabhängigkeit der Tumorheilung beschrieben werden.

Regression

Der frühe Verlauf der Tumorgroße nach Bestrahlung mit Dosen im kurativen Bereich unterscheidet sich nicht grundsätzlich von dem nach hohen subkurativen

Dosen beobachteten Verhalten. Die Tumoren nahmen fast ausnahmslos in den ersten Wochen an Größe noch zu. Danach kam es zu einer Regression mit einer Schrumpfungs-Halbzeit von 1,5 - 2,5 Wochen, die zu unterschiedlichen Resttumorgrößen führte.

Ein interessanter Vergleich zwischen dem Verhalten endgültig geheilter Tumoren und späterer Rezidive ist in Dosisgruppen mit mittlerer Heilungsrate möglich. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die individuellen Volumenkurven nach Bestrahlung mit 45 Gy ambient bzw. 66 Gy anoxisch. In beiden Fällen ist das Volumenverhalten zwischen späterer Heilung und späterem Rezidiv über die ersten 4 - 6 Wochen nach Behandlung nicht systematisch verschieden.

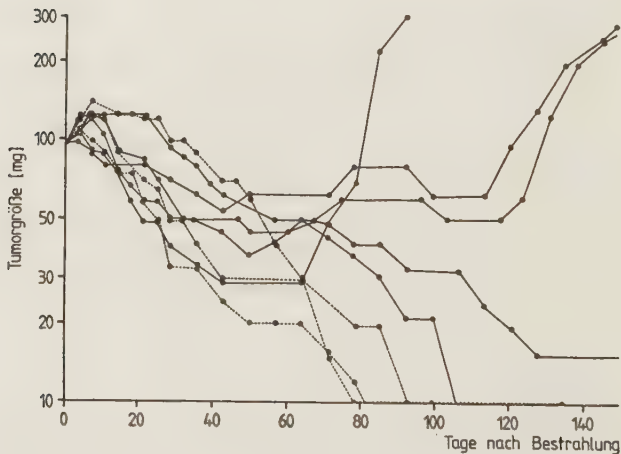


Abb. 19: Individuelle Volumenkurven aller Tumoren der Dosisgruppe 45 Gy ambient. Endgültige Heilungen ---- Rezidive ———.

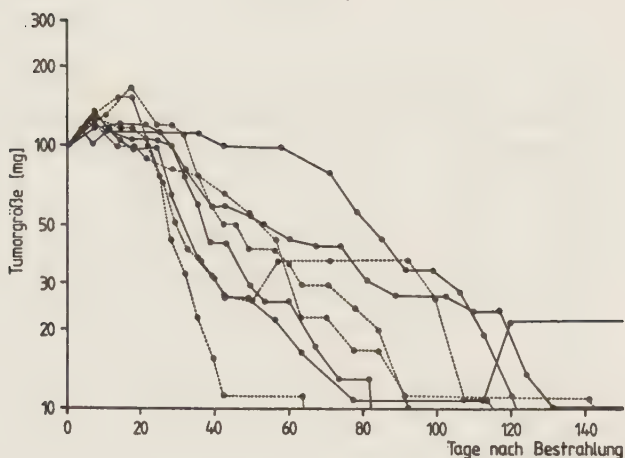


Abb. 20: Individuelle Volumenkurven aller Tumoren der Dosisgruppe 60 Gy anoxisch.
Endgültige Heilungen ----. Rezidive ----.

3.9.1. Dosisabhängigkeit der Heilung

Für die Beurteilung der permanenten Heilung muß zunächst die notwendige Beobachtungsdauer ermittelt werden. Tabelle VII zeigt die zeitabhängige Abnahme der Heilungsrate zwischen dem 4. und 12. Monat in den einzelnen Dosisgruppen der ambienten und anoxischen Bestrahlung. In den ambienten Dosisgruppen stabilisiert sich die Heilungsrate bis zum 6. Monat, in den anoxischen erst mit dem Erreichen des 10. Monats. Die entsprechenden Prozentzahlen sind in Tabelle VIII aufgeführt.

Konkurrierend zum Ereignis Heilung (bzw. Rezidiv) treten dabei die Ereignisse "strahleninduzierter Zweittumor" und "Tod ohne Rezidiv" während der

Dosis	Beobachtungszeit in Monaten				
	IV	VI	VIII	X	XII
anoxisch					
51 Gy	0/10				
58 Gy	6/10	3/10	3/10 *	1,5/10	1,5/10
66 Gy	7/8	5/8	5/8 *	3,75/8	3,75/8
75 Gy	7/7	7/7	6/7	6/7 *	6/7
Dosis					
ambient	IV	VI	VIII	X	XII
20 Gy	0/12				
25 Gy	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
30 Gy	1/7	1/7	1/7	1/7	1/7
35 Gy	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8
40 Gy	3/7	2/7	2/7	2/7	2/7
45 Gy	5/8	3/8	3/8	3/8 **	3/8
51 Gy	7/7	7/7 **	7/7	7/7 *	7/7
58 Gy	7/7	7/7 *	7/7 *	7/7 *	7/7

Tabelle VII: Zeitliche Abhängigkeit der lokalen Heilungsrate. die Zahlen geben die jeweils rezidivfreien (Zähler) und die eingesetzten Tiere (Nenner) an. Das Auftreten von Todesfällen ohne Rezidiv (*) und von strahleninduzierten Zweittumoren (**) ist in den entsprechenden Dosisgruppen gekennzeichnet.

Dosis anoxisch	Beobachtungszeit in Monaten				
	IV	VI	VIII	X	XII
51 Gy	0 %				
58 Gy	60,0 %	30,0 %	25,0 %	15,0 %	15,0 %
66 Gy	87,5 %	62,5 %	62,5 %	50,0 %	50,0 %
75 Gy	100,0 %	100,0 %	85,7 %	85,7 %	85,7 %

Dosis ambient					
	IV	VI	VIII	X	XII
20 Gy	0 %				
25 Gy	10,0 %	10,0 %	10,0 %	10,0 %	10,0 %
30 Gy	14,3 %	14,3 %	14,3 %	14,3 %	14,3 %
35 Gy	25,0 %	25,0 %	25,0 %	25,0 %	25,0 %
40 Gy	42,9 %	28,6 %	28,6 %	28,6 %	28,6 %
45 Gy	62,5 %	37,5 %	37,5 %	37,5 %	37,5 %
51 Gy	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
58 Gy	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Tabelle VIII: Zeitliche Abhängigkeit der lokalen Heilungsrate in prozentualer Darstellung.

Beobachtungszeit auf. Sie bedingen eine Berücksichtigung nach dem Kaplan-Meier'schen Verfahren (35). Die entsprechenden Gruppen sind in Tabelle VII mit * (Todesfälle ohne Rezidiv) und + (strahleninduzierte Zweittumore) gekennzeichnet. Die prozentualen Heilungsziffern verändern sich kaum, weil diese Ereignisse meist relativ spät eintraten (nach Ablauf der Rezidive).

Aus den einzelnen Monatswerten wurde nach einem modifizierten Probit-Programm (20, 21) jeweils die

50 %-Heilungsdosis als Funktion der Zeit berechnet. Diese "tumor - control - dose" (TCD 50) ist mit ihrem 95 %-Konfidenzbereich in Abbildung 21 eingetragen.

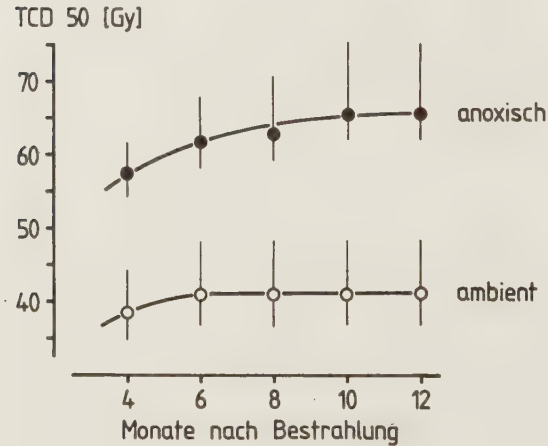


Abb. 21: Mittlere Heilungsdosis (TCD 50) als Funktion der Beobachtungszeit nach Bestrahlung.

Als endgültig dürfen nach dem oben Gesagten die mit dem 10. Monat erreichten Heilungsraten gelten. Zu diesem Zeitpunkt wurde nach dem erwähnten Probit-Programm die Dosisabhängigkeit der Tumorheilung für die Einzeitbestrahlung berechnet und in Abbildung 22 in linearem Maßstab, in Abbildung 23 im kumulativen Wahrscheinlichkeitsnetz eingezeichnet.

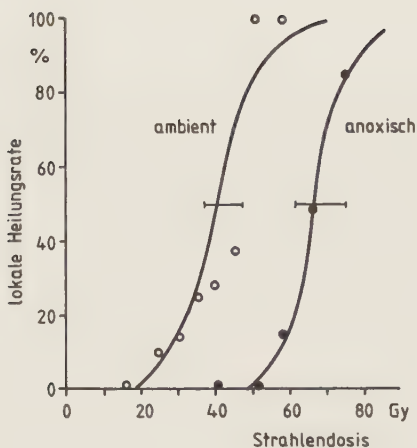


Abb. 22: Dosisabhängigkeit der Tumorheilung nach Einzeitbestrahlung in Luft und unter anoxischen Bedingungen.

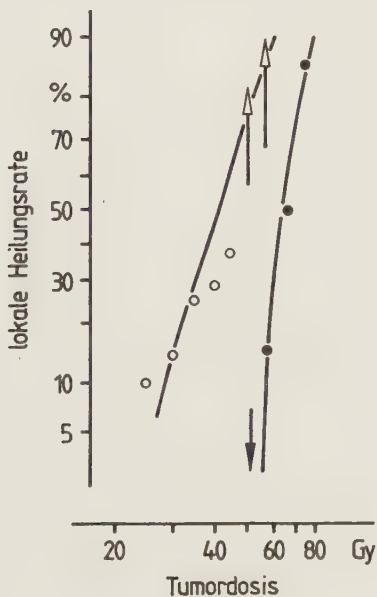


Abb. 23: Dosisabhängigkeit der Tumorheilung wie in Abb. 21, jedoch im kumulativen Wahrscheinlichkeitsnetz.

In linearem Maßstab stellt sich diese Dosiswirkungsbeziehung jeweils als sigmoide Kurve dar, im Wahrscheinlichkeitsnetz annähernd als Gerade. Die anoxische Heilungsrate ist klar zu höheren Dosen hin verschoben. Der Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit ist am besten anhand der mittleren Heilungsdosen (TCD 50 und 95 % Konfidenzbereiche) zu charakterisieren. Die TCD 50 bei ambienter Bestrahlung ist 41,1 Gy (36,9 - 48,1), die TCD 50 bei anoxischer Bestrahlung 65,6 Gy (61,7 - 75,1).

4. Diskussion

4.1. Wachstumsverhalten des unbehandelten Tumors

Die Anforderungen an ein transplantables Tumorsystem für die experimentelle Krebstherapie bestehen unter anderem in Konstanz bzw. Reproduzierbarkeit seiner biologischen Eigenschaften. Dies betrifft auch das makroskopische Wachstumsverhalten.

In der Literatur wird im allgemeinen berichtet, daß autochthone Tumoren mit serieller Passagierung ihr Wachstum beschleunigen, was sich sowohl in einer Zunahme der Wachstumsrate wie auch in einer Verkürzung der Latenzzeit äußert (30). Die meisten experimentell verwendeten Karzinome der Maus besitzen Verdopplungszeiten von etwa 4 Tagen und weniger. Auch über eine Verlangsamung mit fortschreitender Passagierung wurde berichtet, die parallel mit einer Veränderung des histologischen Bildes von einer zunächst epithelialen Struktur über einen Mischtumor hin zu einem fibrösen, sarkomartigen Tumor mit zunehmender Verdopplungszeit verlief (2).

In dem von uns untersuchten Nierenkarzinom wird keine deutliche Veränderung des histologischen Bildes bis zur untersuchten 10. Passage beobachtet, es zeichnet sich jedoch eine Akzeleration des Wachstums ab.

Der spontan gewachsene Tumor zeigt noch ursprüngliches Nierenparenchym mit Glomeruli (Abb. 1). Die Einzelknollen des Tumors weisen tubuläre und trabekuläre Formationen auf, die von sehr großen

epithelartigen Zellelementen gebildet werden (Abb. 2). Dazwischen befinden sich immer wieder kleine landkartenförmige Nekrosen. In den höheren Passagen sieht man vermehrt pseudozystische Formationen. Die relativ gut ausdifferenzierten tubulo-trabekulären Strukturen lassen sich auch hier deutlich erkennen (Abb. 3).

Das Wachstumsverhalten zeigt die in der Literatur beschriebene Beschleunigung und Verkürzung der Latenzzeit. Zwischen der 4. und 8. Passage sind die Unterschiede jedoch relativ gering (Abb. 1). Dies rechtfertigt, daß Tumoren aus diesen Passagen für die Experimente der Wachstumsverzögerung gepoolt verwendet wurden.

Das allgemeine Wachstumsverhalten entspricht in allen Passagen dem für solide Tumoren der Maus typischen Muster. Mit zunehmender Tumorgroße werden die Wachstumskurven bei halblogarithmischer Auftragung stetig flacher, sodaß ein subexponentielles Wachstum zumindest im Meßbereich vorliegt. Zu formalen Beschreibung dieses Wachstums sind verschiedene Verfahren vorgeschlagen worden, die den gesamten Wachstumsverlauf einbeziehen, also auch die Extrapolation in den subklinischen Bereich oder über den meßbaren Bereich hinaus ermöglichen sollen. Die Anpassung der Meßdaten an eine sogenannte Gompertz-Funktion hat dabei die weiteste Verbreitung gefunden (16,30). Sie geht zunächst von einem exponentiellen Wachstum aus, wobei der Wachstumskoeffizient jedoch nicht konstant ist, sondern ebenfalls exponentiell zerfällt.

Es gilt für den Wachstumskoeffizienten

$$A = \frac{dV}{dt} \quad (1)$$

wobei A die Wachstumsrate zu einer gegebenen Zeit bzw. Tumorgröße darstellt.

Für den Bremskoeffizienten α , mit dem die Wachstumsrate zerfällt, gilt

$$\alpha = \frac{dA}{dt} \quad (2)$$

Dieser Koeffizient ist eine Konstante.

Integriert ergeben die Gleichungen 1 und 2 die Volumenwachstumsfunktion

$$V_t = V_0 \cdot e^{A_0/\alpha (1-e^{-\alpha t})}. \quad (3)$$

V_t und V_0 stellen die Tumorgröße zur Zeit t bzw. 0 dar, A_0 die Wachstumsrate zur Zeit $t = 0$.

An der Wachstumskurve der Passage AT 14/8 in Abb. 1 sollen diese Parameter exemplarisch abgeleitet werden. Durch Anlegen der Kurventangente ergibt sich für ein Tumolvolumen von 40 mg eine Wachstumsrate $A_1 = (\ln 2)/5 = 0,14 \text{ d}^{-1}$ und für eine Tumorgröße von 300 mg eine Wachstumsrate $A_2 = (\ln 2)/6,8 = 0,10 \text{ d}^{-1}$.

Der Bremskoeffizient berechnet sich daraus nach der Gleichung

$$A_2 = A_1 \cdot e^{-\alpha(t_2-t_1)}. \quad (4)$$

Nach Logarithmieren ergibt sich

$$\alpha = 0,03 \text{ (d}^{-2}\text{)}.$$

Die Gompertz-Funktion beinhaltet, daß das Tumorstwachstum bei linearer Auftragung eine asymmetrische sigmoide Kurve ergibt, die asymptotisch einer maximalen Größe zustrebt. Dieser Maximalwert berechnet sich aus:

$$V_{\max} = V_t \cdot e^{A_t/\alpha}.$$

Wird die gemessene Wachstumsrate A_t und das zugehörige Tumorstvolumen $V_t = 300$ mg eingesetzt, so ergibt sich

$$V_{\max} = 8,4 \text{ g.}$$

Der Inflektionspunkt der sigmoiden Kurve kennzeichnet den Zeitpunkt mit der größten absoluten Massenzunahme pro Zeiteinheit und liegt bei $V_{\max} \cdot e^{-1}$, demnach bei einer Tumorstgröße von 3 g. Biologisch wichtiger ist die Extrapolation in den subklinischen Bereich, um die Wachstumsrate in der Frühphase bzw. nach abgeschlossener Vaskularisierung des Transplantats (z.B. Tag 4 = t_0) abzuschätzen.

Hierfür gilt:

$$A_0 = A_1 \cdot e^{\alpha(t_1 - t_0)} = 0,23 \text{ d}^{-1}.$$

Dieser Wachstumsrate am Tag 4 entspricht eine Verdopplungszeit $T_d = (\ln 2)/0,23 = 3$ Tage. Die Tumormasse zu dieser Zeit beträgt dann

$$V_0 = V_1 \cdot e^{A_1/\alpha(1 - e^{\alpha(t_1 - t_0)})} = 1,8 \text{ mg.}$$

Als V_0 ergibt sich 1,8 mg, eine Tumorstgröße, die im wesentlichen der Größe des transplantierten Stückes entspricht. Sie braucht mit diesem aber

nicht identisch zu sein; wahrscheinlicher ist ein partieller Untergang des transplantierten Fragments und nachfolgender Zuwachs nach erfolgter Vaskularisierung (11).

Die autoradiographischen Daten ermöglichen eine Abschätzung der Zellneubildungsgeschwindigkeit im Tumor und damit einen Vergleich der Zellproduktionsrate mit der tatsächlichen Wachstumsrate. Im allgemeinen besteht zwischen diesen beiden Größen eine erhebliche Differenz, die sich durch einen der Zellneubildung parallel gehenden stetigen Zellverlust aus dem Tumor erklärt. Die Größe des Zellverlusts stellt bei menschlichen Tumoren häufig das wesentliche Regulativ dar. Für Nagertumoren ist für Karzinome im wesentlichen ein höherer Zellverlust als für Sarkome typisch (4).

Die Zellneubildung läßt sich aus dem Anteil markierter Zellen an der Gesamtpopulation (= Markierungsindex LI) berechnen (29). Die DNA-synthetisierenden Zellen, die sich über die ganze S-Phase verteilen, stellen innerhalb des Mitosezyklus eine sogenannte "markierte Kohorte" dar. Für ihren Durchgang durch die Mitose und damit für ihre Verdopplung benötigt sie ebenfalls die Dauer der S-Phase (T_S).

Hieraus läßt sich eine stündliche Neubildungsrate bzw. eine potentielle Verdopplungszeit (T_{pot}) der Population berechnen.

$$T_{pot} = \frac{T_S \cdot \lambda}{LI}$$

Für die Dauer der S-Phase, die hier nicht experimentell bestimmt wurde, kann ein plausibler Wert von 8 Stunden angenommen werden. Der Korrekturfaktor λ muß wegen der nicht linearen Altersverteilung der wachsenden Population eingesetzt werden und ist mit 0,8 anzusetzen (29). Es ergibt sich demnach eine potentielle Verdopplungszeit des 100 mg-Tumors von

$$T_{\text{pot}} = \frac{0,64}{0,09} = 2,96 \text{ Tage.}$$

Der Zellverlust wird nach Steel (29) als Teilbetrag der Zellneubildungsrate aufgefaßt. Es gilt demnach

$$\frac{1}{T_{\text{pot}}} - \frac{f}{T_{\text{pot}}} = \frac{1}{T_d}$$
$$f = 1 - \frac{T_{\text{pot}}}{T_d}$$

Bei einer Tumorgröße von 100 mg (Verdopplungszeit $T_d = 5,2$ Tage) ergibt sich demnach als Zellverlustfaktor

$$f = 1 - \frac{2,96}{5,2}$$
$$= 0,43$$

Dieser Wert des Zellverlustfaktors liegt für experimentelle Karzinome der Maus eher an der unteren Grenze (4), doch stützen sich die veröffentlichten Werte meist auf relativ anaplastische Karzinome mit hoher Zellproduktion. Auch menschliche Karzinome mit hoher Proliferationsrate, wie Plattenepithelkarzinome (25) und Colonkarzinome (18,28), haben charakteristischerweise ausgesprochen hohe Zellverlustfaktoren. Dagegen kann für differenzierte Adenokarzinome der Niere (24) und der Prostata (23), möglicherweise auch für differenzierte Speicheldrüsentumoren ein niedrigerer Verlustfaktor angenommen werden.

4.2. Ergebnisse der Wachstumsverzögerung

Die Untersuchung der Strahlenwirkung auf den Tumor im subkurativen Bereich ermöglicht bereits wesentliche Aussagen über das Verhalten seiner clonogenen Zellen in situ. Die verwendete Untersuchungsmethode, die sog. Messung der Wachstumsverzögerung, ist in der Tumorstrahlenbiologie weitgehend etabliert (32). Sie beruht darauf, daß der Volumenverlauf des Tumors genau verfolgt und aus den Rezidivwachstumskurven ein dosisabhängiger Parameter abgeleitet wird, der mit dem Überleben der Stammzellen verknüpft ist.

Das Wesentliche hierzu läßt sich anhand der Abbildungen 14 und 15 demonstrieren. Sie zeigen Mittelwertskurven von Tumoren, die mit verschiedenen Einzeldosen unter ambienten bzw. anoxischen Bedingungen behandelt wurden.

Die frühe Volumenreaktion des Tumors erscheint hierbei von der verabreichten Dosis nicht deutlich abhängig. Es ist bekannt, daß diese initialen Volumensänderungen aufgrund der geweblichen Organisation des Tumors das Ausmaß der Stammzellinaktivierung nicht widerspiegeln können. Das Volumen des Tumors nach Bestrahlung besteht zunächst ganz überwiegend aus nicht überlebenden Zellen, die bereits bei einer Dosis von 25 Gy anoxisch mindestens 95 % ausmachen dürften. Das Verschwinden solcher Zellen aus dem Tumor hängt von der Geschwindigkeit ihrer Lyse und Abräumung ab und nicht von der Überlebensrate und vom Behandlungsverfahren. Für Mäusetumoren wird bei-

spielsweise eine relativ große Schrumpfungstendenz bei Karzinomen beobachtet, während der hier beschriebene Tumor eine geringe bzw. verzögerte Schrumpfungstendenz hat, die eher der bei Sarkomen meist beobachteten entspricht (4); diese können häufig sogar mit einer initialen Wachstumszunahme auch bei höheren Dosen reagieren. Unterschiedliche Schrumpfungstendenz unter der Therapie ist auch bei menschlichen Tumortypen gleicher Kurabilität bekannt.

Von diesen initialen Volumensänderungen unterscheidet sich das progressive Rezidivwachstum dadurch, daß es von Überlebenden Stammzellen, die ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit behalten haben, notwendigerweise ausgehen muß. Mit zunehmender Dosis und kleiner werdender Überlebensrate wird daher eine zunehmende Latenzzeit benötigt, bis das echte Rezidiv klinisch manifest wird (z.B. die ursprüngliche Behandlungsgröße überschreitet).

Als dosisabhängiger Effekt, der einer externen Messung leicht zugänglich ist und gleichzeitig die Überlebensrate von Stammzellen als Parameter beinhaltet, kann somit die Rezidivlatenzzeit verwendet werden. Sie wird als Wachstumsverzögerung bezeichnet (32).

Bei der Ableitung dieses Parameters sind mögliche Fehlerquellen zu beachten (3). Es ist wesentlich, daß die Latenzzeit zu einem geeigneten Endpoint abgegriffen wird, der weder von einem relativ großen Residualvolumen des primär behandelten Tumors noch von möglichen eventuell dosisabhängigen Wachs-

tumsstörungen beeinflusst wird. Die Wachstumskurven in Abbildung 14 und 15 legen nahe, daß wegen der fehlenden Schrumpfung nach kleineren Dosen eher ein höherer Endpoint, zum Beispiel das 3-fache der Behandlungsgröße angebracht ist, während nach den höheren Dosen die Tumorschrumpfung eine Auswertung bei einem niedrigeren Volumenniveau erlaubt. Beim Erreichen der 3-fachen Ausgangsgröße wird aber andererseits nach hohen ambienten Dosen bereits eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle sichtbar. Dieser Effekt einer Wachstumsverlangsamung des manifesten Rezidivs nach lokaler Bestrahlung ist als sogenannter Tumorbetteffekt bekannt (3, 11). Er geht darauf zurück, daß eine Schädigung im Gefäßbindegewebe im und um den Tumor das Wachstum limitiert. Der Tumorbetteffekt ist in manchen Tumorsystemen deutlich dosisabhängig (26, 33). Histologisch drückt er sich meist in einer zunehmenden Nekroseneigung, beziehungsweise in erhöhtem Zellverlust des Tumorparenchyms aus (10, 11).

Einen guten Überblick über die Dosisabhängigkeit eines möglichen Tumorbetteffekts erhält man durch eine Auftragung der Volumenverdopplungszeit beispielsweise vom Doppelten zum Vierfachen der Ausgangsgröße ($T_{200/400}$).

Die Darstellung der Abbildung 16 zeigt für die anoxische Bestrahlung ab 20 Gy eine Zunahme auf das etwa 1,4-fache der Kontrolle, jedoch keine weitere Zunahme mit steigender Dosis. Nach ambienter Bestrahlung tritt eine steile Zunahme ab etwa 30 Gy auf.

Histologisch weisen jedoch die untersuchten Tumorrezidive bei nahezu allen Dosen eine fast normale Gewebszusammensetzung auf.

Als universell verwendbarer Endpoint nach ambionter sowie anoxischer Bestrahlung erscheint nach dem bisher Gesagten am besten das 2-fache der Tumorausgangsgröße geeignet.

Die hierfür abgeleiteten Dosiseffektkurven der Wachstumsverzögerung in Abbildung 18 weisen die charakteristischen Merkmale auf, die auch bei anderen Tumorsystemen gefunden wurden: Die Kurve nach anoxischer Bestrahlung beginnt relativ flach mit einer weiten Schulter und nimmt an Steigung stetig zu. Die ambiente Kurve ist biphasisch; nach einem relativ steilen Anfangsteil erreicht sie bei ca. 30 Gy einen Knick und setzt sich dann mit geringerer Steigung fort.

Man kann davon ausgehen, daß der biphasischen Kurve nach ambionter Bestrahlung eine gemischte Zellpopulation zugrundeliegt, die sich aus einer großen Zahl euoxischer und einem kleinen Anteil hypoxischer aber strahlenresistenter Zellen zusammensetzt. Im zweiten Teil der Kurve überleben praktisch keine euoxischen Zellen mehr, so daß das Rezidivwachstum von den resistenten hypoxischen Zellen ausgeht. Ein Maß für die hypoxischen Zellen ist der vertikale Abstand der Kurven im hypoxischen Bereich. Er beträgt etwa 6 - 8 Tumordopplungszeiten, was einer hypoxischen Fraktion von 2^{-6} bis 2^{-8} entsprechen könnte. Dieses Verfahren zur Abschätzung der hypoxischen Fraktion ist jedoch mit großen Unsicherheiten belastet (8).

Im niedrigen Dosisbereich, der den initialen steilen Abschnitt der ambienten Kurve einschließt, läßt sich die Reaktion euoxischer und künstlich hypoxischer Zellen (anoxische Kurve) direkt vergleichen. Die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit des Tumors aufgrund der Oxygenierung drückt sich hierbei im Verhältnis isoeffektiver Dosen aus. Im Mittel liegt in diesem Dosisbereich der Quotient isoeffektiver Dosen, der sogenannte OER (Sauerstoffverstärkungsfaktor) bei ca. 1,7. Vergleichbare Werte liefern auch andere Tumorsysteme im Wachstumsverzögerungsexperiment (6).

Diese Betrachtung zeigt, daß die Methode der Wachstumsverzögerung beim Nierenkarzinom wohldefinierte Dosiseffektkurven liefert, in die als wesentliches Element die zelluläre Strahlenempfindlichkeit eingeht. In diesem Fall ist der Schluß erlaubt, daß einer bestimmten Wachstumsverzögerung eine bestimmte Zahl Überlebender Zellen entspricht, die von der Behandlungsweise unabhängig ist. Das System ist demnach geeignet, die Wirksamkeit anderer Behandlungsmodalitäten, z.B. einer fraktionierten Bestrahlung quantitativ zu untersuchen und zellulär zu interpretieren (5, 7).

4.3. Dosisabhängigkeit der Tumorheilung

Die Bewertung des kurativen Erfolgs, d.h. ob ein Tumor durch die Bestrahlung lokal dauernd geheilt wurde oder nicht, richtet sich im Tierexperiment nach den gleichen Kriterien wie in der Klinik und

setzt auch die gleichen Beobachtungen voraus. Wie in dem vorhergehenden Kapitel beschrieben, reagiert das Tumolvolumen auch nach hohen Dosen zunächst mit einer Zunahme, dann erst mit einer Regression. Wo die Schrumpfung ungestört (d.h. ohne Rezidiv) verfolgt werden kann, führt sie mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 2 - 3 Wochen auf einen kleinen Resttumor von 10 mg und weniger. Zumindest über die ersten 4 Wochen nach der Einzeitbestrahlung ist dabei zwischen endgültigen Heilungen und späteren Rezidiven kein Unterschied festzustellen, der prognostisch verwertbar ist (6).

Nach den niedrigeren kurativen Dosen kommt es nicht selten noch aus der Regression heraus, nach den höheren Dosen eher aus einer völligen, oft monatelangen Remission heraus wieder zu einem progressiven Tumorwachstum, dem Lokalrezidiv. Die Häufigkeit dieses Ereignisses nimmt mit steigender Dosis ab, die Häufigkeit der Rezidivfreiheit (Tumorheilung) entsprechend zu. Wie auch beim Menschen kann von einer Dauerheilung nur dann gesprochen werden, wenn das zeitliche Rezidivmuster hinreichend bekannt ist. Der für transplantable Mäusetumoren übliche Beobachtungszeitraum von 6 Monaten erwies sich im vorliegenden Fall als zu kurz und mußte auf 10 Monate erweitert werden.

Während beim Menschen strahleninduzierte Tumoren im Behandlungsfeld selten und dann mit sehr viel größerer Latenz als echte Rezidive auftreten, können sich im Nagerexperiment beide Ereignisse zeitlich überlappen (31). Für den hier verwen-

ten NMRI - Mäusestamm wurde bereits früher nachgewiesen (14), daß strahleninduzierte Sarkome bereits nach einem Jahr auftreten können. Im vorliegenden Fall wurde dieses Ereignis einmal im 6. Monat und einmal im 10. Monat registriert und konnte nur aus dem histologischen Bild verifiziert werden. Das vorzeitige Ausscheiden eines rezidivfreien Tieres, sei es mit dem konkurrierenden Ereignis "Zweitumor" oder "Tod" muß bei der Berechnung der endgültigen Heilungsrate berücksichtigt werden (35).

Bei einer graphischen Auftragung der Heilungsrate gegen die Dosis ergeben sich typische sigmoide Kurven (Abb. 22). Sie besitzen eine scheinbare Dosischwelle und erreichen ihre größte Steilheit bei mittleren Heilungsraten. Zur Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit des Tumors in situ ist vor allem die TCD 50 geeignet, d.h. die Bestrahlungsdosis bei der eine Heilungswahrscheinlichkeit von 50 % erreicht wird. Diese Dosis hängt von den Bestrahlungsbedingungen ab und beträgt hier für die ambient bestrahlten Tumoren 41,1 Gy, bei den unter Anoxie bestrahlten dagegen 65,6 Gy.

Diese Werte liegen nahe bei denen anderer Transplantattumoren der Maus, die im gleichen Labor mit gleicher Technik untersucht wurden. Als Beispiele lassen sich anführen ein Fibrosarkom (TCD 50 ambient/ anoxisch 54 / 62 Gy (15)), das Harding-Passey-Melanom (TCD 50 44,1 / 56,1 Gy (14)) und ein langsam wachsendes Mammakarzinom (TCD 50 45 / 60 Gy (27)). Es zeigt sich, wie auch bei den häufigsten menschlichen Tumoren, daß die Unterschiede

in der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren unterschiedlicher Histologie relativ gering sind (34).

Die Dosisabhängigkeit der Tumorheilung läßt sich heute weitgehend aus der Strahlenwirkung auf die Tumorzelle interpretieren (36). Die wichtigste Strahlenwirkung auf die Zelle in Hinblick auf die Tumorheilung ist die, daß unbegrenzt vermehrungsfähige Tumorzellen durch Bestrahlung sterilisiert werden. In der Zellkultur wird das Überleben einer Zelle durch den sogenannten Makrokoloniebildungstest quantifiziert, den Puck und Mitarbeiter 1955 entwickelt haben (22).

Dosiswirkungskurven der Zellinaktivierung lassen sich bei halblogarithmischer Auftragung als exponentielle Schulterkurven beschreiben. Die Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit im exponentiellen Teil der Kurve erfolgt durch die Kenn-dosis D_0 , die die Überlebensrate jeweils um den Faktor e (= Basis der natürlichen Logarithmen) weiter vermindert. Für Säugetierzellen (maligne oder nicht maligne) liegen diese D_0 -Werte bei Bestrahlung in Luft bei ca. $1,3 \pm 0,2$ Gy.

Die heutige strahlenbiologische Lehrmeinung geht dahin, daß in nicht antigenen Tiertumoren die Tumoreradikation nur dann gegeben ist, wenn keine klonogene Zelle überlebt. Umgekehrt genügt bereits eine klonogene Zelle zum Rezidiv. Aufgrund des exponentiellen Verlaufs der Überlebenskurve können mit zunehmender Dosis beliebig kleine Werte der Überlebensrate, jedoch nicht null erreicht werden. Hierzu ist es notwendig zu wissen, daß die Überlebenskurve stets einen Mittelwert definiert.

Da Zellen nur ganzzahlig (0, 1, 2, ...) überleben können, muß die Häufigkeit, mit der diese Ereignisse eintreten ($P(0)$, $P(1)$, $P(2)$) nach einer diskreten Verteilung um den Mittelwert herum liegen. Die zutreffende Verteilung ist die Poisson-Verteilung. Die Wahrscheinlichkeit, daß keine Zelle mehr überlebt ($P(0)$), folgt dabei dem Ausdruck

$$P(0) = e^{-\mu}, \text{ wobei } \mu \text{ der Mittelwert ist.}$$

Der Mittelwert der Überlebensrate ist für hohe Einzeldosen durch folgenden Ausdruck gegeben:

$$\mu = n \cdot e^{-D/D_0};$$

wobei n die sog. Extrapolationszahl aus der Rückextrapolation des exponentiellen Kurventeils zur Ordinate und D die eingestrahlte Dosis darstellt.

Für eine Heilungswahrscheinlichkeit von 50 %

($P(0)=0,5$) gilt:

$$0,5 = e^{-\mu} = e^{-n \cdot N \cdot e^{-TCD_{50}/D_0}}$$

Hierbei ist N die Zahl effektiver clonogener Zellen, TCD_{50} die 50 %-Heilungsdosis.

Von diesen zellulären Parametern ist im vorliegenden Fall keiner gemessen, aber plausible Schätzwerte sind möglich.

Unter Annahme einer Extrapolationszahl von 4 und einer D_0 von 3,9 Gy ergibt eine Auflösung der Gleichung nach der Zahl N der clonogenen Zellen dann für hypoxische Bestrahlungsbedingungen:

$$0,5 = e^{-4 \cdot N \cdot e^{-TCD_{50}/D_0}}$$

$$N = 5 \cdot 10^6$$

Bei einer Ausgangszahl von schätzungsweise $3 \cdot 10^7$ Zellen im 100 mg Tumor heißt das, daß jede 6. Tumorzelle clonogen ist und durch die Bestrahlung

inaktiviert werden muß, um zur in situ gemessenen Heilungskurve zu kommen.

Die Interpretation der ambienten Heilungskurve erfolgt aus ähnlichen Überlegungen. Die Kurve besitzt eine ähnliche Gestalt, woraus folgt, daß die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der kritischen Population nicht geringer ist. Tatsächlich hat sich gezeigt, daß in praktisch allen soliden Tiertumoren die Kurabilität bei Einzeitbestrahlung in Luft durch eine Fraktion chronisch hypoxischer Zellen bestimmt wird.

Der Unterschied zur künstlich anoxischen Bestrahlung besteht demnach vereinfacht ausgedrückt in der verschiedenen Größe der kritischen Zellzahl N. Unter der Annahme, daß einer Heilungsrate von 50% jeweils die gleiche Überlebende Zellzahl zugrunde liegt, kann aus dem Dosisunterschied (TCD_{50} anoxisch minus TCD_{50} ambient) die sogenannte hypoxische Fraktion berechnet werden.

$$\begin{aligned} \text{Hypoxische Fraktion} &= e^{-\frac{\Delta TCD_{50}}{D_0}} \\ &= e^{-\frac{65,6-41,1}{3,9}} \\ &= 1,8 \cdot 10^{-3}. \end{aligned}$$

Im Vergleich zu anderen Tiertumoren, bei denen die häufigsten Werte zwischen 5 und 30 % liegen, entspricht diese Zahl einer ausgesprochen kleinen hypoxischen Fraktion (9, 13). Zusätzlich läßt sich feststellen, daß auch die Variabilität der hypoxischen Fraktion von Tumor zu Tumor im Nierenkarzinom AT 14 gering zu sein scheint. Dies ergibt sich aus

dem fast parallelen Verlauf der beiden Heilungskurven. Eine nennenswerte Streuung in der Größe der hypoxischen Fraktion und damit der zu inaktivierenden Zellzahl würde zu einer relativen Abflachung der ambienten Heilungskurve führen, wie sie in den transplantablen Tumoren häufig zu beobachten ist (14).

5. Zusammenfassung

An einem spontanen Nierenkarzinom einer NMRI-Maus der Linie Neuherberg wurden Transplantabilität, Wachstumsparameter und die Strahlenempfindlichkeit in situ untersucht. In seiner Histologie war der Tumor dem menschlichen hypernephroiden Adenokarzinom ähnlich.

Nach Implantation der Tumorstückchen fand sich in etwa 80 % der Tiere 3 Wochen später ein progressiv wachsendes Tumorknötchen. Der Tumor wies bei fortlaufender Transplantation eine Akzeleration auf. In der 3. Passage wurden 100 mg Tumormasse nach durchschnittlich 47 Tagen erreicht, in der 8. Passage nach 27 Tagen. Die Verdopplungszeit (von 200 auf 400 mg) nahm gleichzeitig von 9 auf etwa 5 Tage ab. Das Wachstum ließ sich durch die Gompertz-Funktion befriedigend beschreiben.

Die Wachstumskurven nach Bestrahlung mit subkurativen Einzeldosen zeigten eine mäßige bzw. verzögerte Schrumpfungseignung des Tumors, jedoch eine mit der Dosis eindeutig zunehmende Latenzzeit bis zum progressiven Rezidivwachstum. Die daraus abgeleitete Dosisabhängigkeit der Wachstumsverzögerung ergab für anoxische Bestrahlungsbedingungen eine monophasische, für ambiente eine steilere, biphasische Dosiseffektkurve. Aus der Höhe der "Knickdosis" (30 Gy) und der relativen Lage beider Kurven zueinander läßt sich eine relativ kleine Fraktion natürlich hypoxischer Zellen im Tumor postulieren. Aus dem Vergleich isoeffektiver Dosen wurde für den euoxischen Anfangsteil der ambienten Kurve ein

Sauerstoffverstärkungsfaktor von ca. 1,7 abgeleitet.

Nach Bestrahlung mit kurativen Einzeldosen betrugen die mittleren Heilungsdosen (TCD 50) für die anoxisch bestrahlten Tumoren 65,6 Gy, für die ambienten Tumoren 41,1 Gy. Die beiden Heilungskurven verliefen im wesentlichen parallel und relativ steil. Aus dem Dosisunterschied TCD 50 anoxisch minus TCD 50 ambient ließ sich die Größe der hypoxischen Fraktion genauer abschätzen. Unter Annahme einer D_0 von 3,9 Gy (anoxisch) ergab sich ein Wert von $1,8 \times 10^{-3}$, der im Vergleich zu anderen Tiertumoren ausgesprochen niedrig liegt.

Allgemein kann festgestellt werden, daß dieses Nierenkarzinom der NMRI-Maus hinsichtlich morphologischer Konstanz, Wachstumsverhalten und Transplantabilität sowie der Strahlenreaktion in situ ein aussichtsreiches System darstellt, zumal differenzierte Nierenkarzinome der Maus bisher kaum beschrieben wurden.

6. Literaturverzeichnis

1. BARENDSEN, G.W., BROERSE, J.J.: Differences in radiosensitivity of cells from various types of experimental tumors in relation to the RBE of 15 MeV neutrons. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 3, (1977), 211 - 214.
2. BEGG, A.C.: Kinetic and histological changes of a serially transplanted mouse tumour. Cell Tissue Kinet. 4, (1971), 401 - 411.
3. BEGG, A.C.: Analysis of growth delay data: potential pitfalls. Brit. J. Cancer 41, Supp. IV, (1980), 93 - 97.
4. DENEKAMP, J.: The relationship between the "cell loss factor" and the immediate response to radiation in animal tumours. Europ. J. Cancer 8, (1972), 335 - 340.
5. DENEKAMP, J., HARRIS, S.R.: Studies of the processes occurring between two fractions in experimental mouse tumours. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1, (1976), 421 - 430.
6. DENEKAMP, J.: Tumour regression as a guide to prognosis: a study with experimental animals. Brit. J. Radiol. 50, (1977), 271 - 279.
7. DENEKAMP, J., STEWART, F.A.: Evidence for reduced repair capacity in mouse tumours relative to skin. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5, (1979), 2003 - 2010.

8. DENEKAMP, J., HIRST, D.G., STEWART, F.A.,
TERRY, N.H.A.: Is tumour radiosensi-
tisation by misonidazole a general
phenomenon? Brit. J. Cancer 41, (1980),
1 - 9.
9. DENEKAMP, J.: Cell kinetics and cancer therapy.
Charles C. Thomas Publisher, Spring-
field, Illinois, USA, (1982).
10. GERTE, M.: Untersuchungen zur Wachstumskinetik
am rezidivierenden Harding - Passey -
Melanom der Maus nach subkurativer Be-
strahlung. Diss., Universität München,
(1978).
11. Holler, E.: Einfluß einer Tumorbettbestrahlung
auf Wachstum und Proliferationsverhal-
ten des Harding - Passey - Melanoms
der Maus. Diss., Universität München,
(1981).
12. HUG, O.: Strahlenbiologische Begründung,
Methoden und Aussichten einer präope-
rativen Tumorbestrahlung. In: Präope-
rative Tumorbestrahlung (Herausgeber:
O. Hug) Urban & Schwarzenberg, München -
Berlin - Wien, (1971), pp. 115 - 127.
13. KALLMAN, R.F.: The phenomenon of reoxygenation
and its implications for fractionated
radiotherapy. Radiology 105, (1972),
135 - 142.
14. KUMMERMEHR, J.: Kurabilität des Harding -
Passey - Melanoms durch Einzeitbestrah-
lung. Strahlentherapie 154, (1978),
578 - 581.

15. KUMMERMEHR, J.: Jahresbericht 1979, Gruppe Experimentelle Tumorthherapie, GSF - Bericht B. 1108, (1980), 27 - 28.
16. LAIRD, A.K.: Dynamics of growth in tumors and in normal organisms. In: Human tumor cell kinetics, Natl. Cancer Inst. Monograph 30, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bethesda, Maryland, USA, (1969), 15 - 28.
17. VON LIEVEN, H.: Klinische Ergebnisse der präoperativen Bestrahlung beim Adenokarzinom der Niere. Strahlentherapie 154, (1978), 1 - 7.
18. MEYER, J.S., PRIOLEAU, P.G.: S-phase fractions of colorectal carcinomas related to pathologic and clinical features. Cancer 48, (1981), 1221 - 1228.
19. MURPHY, G.P., HRUSHEVSKY, W.J.: A murine renal cell carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 50, (1973), 1013 - 1025.
20. PORTER, E.H.: The statistics of dose-cure relationships for irradiated tumors. Brit. J. Radiol. 53, (1980), 210 - 217.
21. PREUSS - BAYER, G.: Jahresbericht 1980, Gruppe Experimentelle Tumorthherapie, GSF - Bericht B 1253, (1981), 34 - 36.
22. PUCK, T.T., MARKUS, P.J.: Actions of X-rays on mammalian cells. J. Exp. Med. 103, (1956), 653 - 660.

23. RABES, H.M., FAUL, P.: Bestimmung der Proliferationsaktivität von menschlichen Prostata-Punktaten durch Thymidin - ^3H - Autoradiographie. Verh. Dtsch. Ges. Path. 57, (1973), 318 - 322.
24. RABES, H.M., CARL, P., MEISTER, P., RATTENHUBER, U.: Analysis of proliferative compartments in human tumors. I. Renal adenocarcinoma. Cancer 44, (1979), 799 - 813.
25. REFSUM, S.B., BERDAL, P.: Cell loss in malignant tumours in man. Europ. J. Cancer 3, (1967), 235 - 236.
26. SCHLECHTWEG, K.: Zeitfaktoruntersuchungen der Strahlenwirkung auf das Harding - Passey-Melanom der Maus. Diss., Universität München, (1978).
27. SEDLMEIER, H.: Wachstumseigenschaften und Strahlenreaktion eines langsam wachsenden Adenokarzinoms der Maus. Diss., Universität München, (1984).
28. STAHL, C.: Proliferationsmuster in Tumoren und entzündlichen Erkrankungen des menschlichen Colons. Diss., Universität München, (1983).
29. STEEL, G.G.: Cell loss from experimental tumours. Cell Tissue kinet. 1, (1968), 193 - 207.
30. STEEL, G.G.: Growth kinetics of tumours. Clarendon Press, Oxford, (1977).

31. SUIT, H.D., SEDLACEK, R., FAGUNDES, L.,
GOITEIN, M., ROTHMAN, K.J.: Time
distributions of recurrences of im-
munogenic and nonimmunogenic tumors
following local irradiation. Rad.
Res. 73, (1978), 251 - 266.
32. THOMLINSON, R.H., CRADDOCK, E.A.: The gross
response of an experimental tumour
to single doses of X-rays. Brit. J.
Cancer 12, (1967), 108 - 123.
33. TROTT, K.-R., KUMMERMEHR, J.: Split-dose
recovery of a mouse tumour and its
stroma during fractionated irradiation.
Brit. J. Radiol. 55, (1982),
841 - 846.
34. TROTT, K.-R.: Zelluläre Grundlagen der Radio-
therapieresistenz. Proc. Internationa-
les Symposium Über Chemotherapie- und
Strahlentherapieresistenz, Regensburg,
(1983). Im Druck.
35. UICC: Berechnung von Überlebenskurven.
Die Methode von Kaplan - Meier. In:
TNM - Klassifikation von malignen
Tumoren. Springer Verlag, Berlin -
Heidelberg - New York, (1979),
167 - 169.
36. WITHERS, H.R., PETERS, L.J.: Biological
Aspects of Radiation Therapy. In:
Fletcher, G.: Textbook of Radiothe-
rapy. Lea & Febiger, Philadelphia,
(1980), 103 - 180.

7. Lebenslauf

Am 24.9.1948 wurde ich, Gerd Merinsky, als 3. Kind des Regierungsvermessungsrates Adolf Merinsky und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Einsiedler, in Schwäbisch Gmünd geboren.

1955 trat ich in die Volksschule ein. Nach 4 Jahren besuchte ich dann das Parler Gymnasium in Schwäbisch Gmünd. Im Juni 1969 erlangte ich die allgemeine Hochschulreife.

Vom September 1969 bis zum März 1972 war ich in der Einhorn Apotheke in Schwäbisch Gmünd als Apothekerpraktikant tätig. Anschließend legte ich die Pharmazeutische Vorprüfung ab. Danach arbeitete ich als vorexaminierter Apotheker.

Im Sommersemester 1974 nahm ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Humanmedizin auf. Im April 1976 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung. Im Mai 1981 schloß ich mit bestandener Ärztlicher Prüfung mein Studium ab.

Die Approbation als Arzt wurde mir am 5.6.1981 erteilt. Ab August 1981 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Backnang. Im Juli 1983 wechselte ich als Assistenzarzt in die Chirurgische Abteilung über.

